(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-521407
(P2005-521407A)
(43)公表日　平成17年7月21日(2005.7.21)

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/21	C12N 1/21		4B050
C12N 9/12	C12N 9/12		4B065
C12N 9/16	C12N 9/16	B	
C12N 9/18	C12N 9/18		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 98 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2003-580558(P2003-580558)
(86)(22)出願日	平成15年3月28日(2003.3.28)
(85)翻訳文提出日	平成16年11月29日(2004.11.29)
(86)国際出願番号	PCT/US2003/009585
(87)国際公開番号	WO2003/083125
(87)国際公開日	平成15年10月9日(2003.10.9)
(31)優先権主張番号	60/368,949
(32)優先日	平成14年3月29日(2002.3.29)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/368,858
(32)優先日	平成14年3月29日(2002.3.29)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/376,343
(32)優先日	平成14年4月29日(2002.4.29)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人　500284580
ジェネンコー・インターナショナル・インク
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　パロ・アルト、ページ・ミル・ロード　９２５
(74)代理人　100071010
弁理士　山崎　行造
(74)代理人　100121762
弁理士　杉山　直人
(74)代理人　100126767
弁理士　白銀　博
(74)代理人　100122839
弁理士　星　貴子
(74)代理人　100118647
弁理士　赤松　利昭

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バチルスにおけるタンパク質発現の増大

(57)【要約】
本発明は発現タンパク質を生成する能力を変化させるために遺伝子組換えした細胞を提供する。特に、本発明は、目的タンパク質の発現が増大したバチルス種などのグラム陽性細菌に関し、ここで１以上の染色体遺伝子が不活性化され、好ましくは１以上の染色体遺伝子がバチルス染色体から欠失される。いくつかの実施態様において、１以上の固有の染色体領域が対応する野生型バチルス宿主染色体から欠失される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
バチルス由来の目的タンパク質の発現を増大させる方法であって、
ａ）目的タンパク質を生成できる変異バチルス株を得る工程であって、ここで前記変異バチルス株はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される少なくとも１の不活性化染色体遺伝子を有する当該工程；及び
ｂ）前記変異バチルス株を前記目的タンパク質が前記変異バチルス株により発現する条件下で成長させる工程であって、ここで前記目的タンパク質の発現は非変異バチルス宿主株の前記タンパク質の発現と比較して増大している当該工程
を含む、当該方法。
【請求項２】
目的タンパク質が相同タンパク質及び異種タンパク質からなる群より選択される、請求項１の方法。
【請求項３】
目的タンパク質がプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼからなる群より選択される酵素である、請求項１の方法。
【請求項４】
目的タンパク質がプロテアーゼである、請求項３の方法。
【請求項５】
前記変異バチルス株が、ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される１以上の染色体遺伝子を欠失することにより得られる、請求項１の方法。
【請求項６】
請求項１の方法を用いて得られる変異バチルス株。
【請求項７】
ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される１以上の遺伝子の染色体欠失を含む変異バチルス株。
【請求項８】
前記変異株がＢ．ズブチリス株である、請求項７の変異バチルス株。
【請求項９】
前記変異バチルス株がプロテアーゼ生成株である、請求項７の変異バチルス株。
【請求項１０】
前記プロテアーゼがズブチリシンである、請求項９の変異バチルス株。
【請求項１１】
前記ズブチリシンがズブチリシン１６８、ズブチリシンＢＰＮ’、ズブチリシン・カールスバーグ、ズブチリシンＤＹ、ズブチリシン１４７、ズブチリシン３０９及びこれらの変異体からなる群より選択される、請求項１１の変異バチルス株。
【請求項１２】
前記変異バチルス株がｄｅｇＵ、ｄｅｇＱ、ｄｅｇＳ、ｓｃｏＣ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子の変異をさらに含む、請求項７の変異バチルス株。

【請求項１３】
前記変異バチルス株がさらに目的異種タンパク質を含む、請求項７の変異バチルス株。
【請求項１４】
ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤ、それらの遺伝子断片及びそれらの相同配列からなる群より選択される少なくとも１の遺伝子を含むＤＮＡ構築体。
【請求項１５】
前記少なくとも１の遺伝子が配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号１７、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号３７、配列番号２５、配列番号２１、配列番号５０、配列番号２９、配列番号２３、配列番号２７、配列番号１９、配列番号３１、配列番号４８、配列番号４６、配列番号３５及び配列番号３３からなる群より選択される少なくとも１の核酸配列を含む、請求項１４のＤＮＡ構築体。
【請求項１６】
前記構築体が目的タンパク質をエンコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１４のＤＮＡ構築体。
【請求項１７】
請求項１６のＤＮＡ構築体を含むプラスミド。
【請求項１８】
請求項１７のプラスミドを含む宿主細胞。
【請求項１９】
前記宿主細胞がバチルス細胞及び大腸菌細胞からなる群より選択される、請求項１８の宿主細胞。
【請求項２０】
前記宿主細胞がＢ．ズブチリスである、請求項１９の宿主細胞。
【請求項２１】
前記ＤＮＡ構築体が前記宿主細胞の染色体内に統合された、請求項１８の宿主細胞。
【請求項２２】
前記少なくとも１の遺伝子が配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号１８、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５１、配列番号３８、配列番号２６、配列番号２２、配列番号５７、配列番号３０、配列番号２４、配列番号２８、配列番号２０、配列番号３２、配列番号５５、配列番号５３、配列番号３６及び配列番号３４からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列をエンコードする、請求項１４のＤＮＡ構築体。
【請求項２３】
さらに選択マーカーを含み、ここで選択マーカーが前記遺伝子断片またはそれに相同な遺伝子配列の断片の両側に位置する、請求項１４のＤＮＡ構築体。
【請求項２４】
入来配列を含むＤＮＡ構築体であって、前記入来配列は目的タンパク質をエンコードする核酸及び相同ボックスを含む両側に位置する選択マーカーを含み、相同ボックスはｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される少なくとも１の遺伝子のコード領域のすぐ隣に位置する配列に対して８０～１００％配列同一性を有する核酸配列を含むＤＮＡ構築体。

【請求項２５】
前記遺伝子のコード配列に隣接する少なくとも１の核酸をさらに含む、請求項２４のＤＮＡ構築体。
【請求項２６】
請求項２５のＤＮＡ構築体を含むプラスミド。
【請求項２７】
請求項２６のプラスミドを含む宿主細胞。
【請求項２８】
前記宿主細胞がバチルス細胞及び大腸菌細胞からなる群より選択される、請求項２７の宿主細胞。
【請求項２９】
前記宿主細胞がバチルス・ズブチリスである、請求項２８の宿主細胞。
【請求項３０】
前記ＤＮＡ構築体が宿主細胞染色体内に統合されている、請求項２６の宿主細胞。
【請求項３１】
前記選択マーカーが前記宿主細胞染色体から切除されている、請求項３０の宿主細胞。
【請求項３２】
プロテアーゼ生成が増大した変異バチルス株を得る方法であって、
ａ）請求項１４のＤＮＡ構築体を含むバチルス宿主細胞を形質転換する工程であって、前記ＤＮＡ構築体中の目的タンパク質がプロテアーゼであり、前記ＤＮＡ構築体が少なくとも１の遺伝子が不活性化されて変異バチルス株を生成する条件下でバチルス宿主細胞の染色体内に統合される工程；及び
ｂ）増大したプロテアーゼ生成が得られる条件下で前記変異バチルス株を成長させる工程
を含む、当該方法。
【請求項３３】
前記プロテアーゼを回収する工程をさらに含む、請求項３２の方法。
【請求項３４】
少なくとも１の不活性化遺伝子が前記変異バチルス株の染色体から欠失される、請求項３２の方法。
【請求項３５】
請求項３２の方法を用いて生成した変異バチルス株。
【請求項３６】
前記バチルス宿主株が、Ｂ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．ロータス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．メガテリウム及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される、請求項３３の方法。
【請求項３７】
前記バチルス宿主細胞がＢ．ズブチリスである、請求項３６の方法。
【請求項３８】
変異バチルスにおけるプロテアーゼ発現を増大させる方法であって、
ａ）バチルス宿主細胞を請求項２４のＤＮＡ構築体を用いて形質転換する工程：
ｂ）前記ＤＮＡ構築体と前記バチルス宿主細胞の染色体領域を相同組換えする工程であって、ここで前記バチルス宿主細胞染色体の少なくとも１の遺伝子が不活性化され、変異バチルス株を生成する工程；及び
ｃ）プロテアーゼ発現に適した条件下で前記変異バチルス株を成長させる工程であって、ここで前記プロテアーゼの生成が工程ａ）の形質転換前のバチルス・ズブチリス宿主と比較して変異バチルス・ズブチリス株におけるほうが大きい工程
を含む、当該方法。

【請求項３９】
前記プロテアーゼがズブチリシンである、請求項３８の方法。
【請求項４０】
前記プロテアーゼが組換えプロテアーゼである、請求項３８の方法。
【請求項４１】
前記不活性化が少なくとも１の前記遺伝子の欠失によるものである、請求項３８の方法。
【請求項４２】
前記不活性化が少なくとも１の前記遺伝子の挿入不活性化によるものである、請求項３８の方法。
【請求項４３】
請求項３８の方法を用いて得た変異バチルス株。
【請求項４４】
前記変異バチルス株がｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される少なくとも１の不活性化遺伝子を含む、請求項４３の変異バチルス株。
【請求項４５】
前記不活性化遺伝子が欠失により不活性化された、請求項４４の変異バチルス株。
【請求項４６】
ｄｅｇＵ、ｄｅｇＳ、ｄｅｇＱ、ｓｃｏＣ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子における少なくとも１の変異をさらに含む、請求項４４の変異バチルス株。
【請求項４７】
前記変異がｄｅｇＵ（Ｈｙ）３２である、請求項４６の変異バチルス株。
【請求項４８】
前記株が組換えプロテアーゼ生成株である、請求項４４の変異バチルス株。
【請求項４９】
前記変異バチルス株がＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．ロータス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．メガテリウム及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される、請求項４４の変異バチルス株。
【請求項５０】
１以上の固有染色体領域またはそれらの断片の欠失を含む変異バチルス株であって、
前記固有染色体領域が約０．５～５００ｋｂを含み、及び前記変異バチルス株が前記変異及び非変異バチルス株を本質的に同じ成長条件下で成長させた場合、対応する非変異バチルス株と比較して目的タンパク質の発現レベルが増大している、
当該変異バチルス株。
【請求項５１】
前記変異バチルス株がＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．ロータス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．メガテリウム及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される、請求項５０の変異バチルス株。
【請求項５２】
前記変異バチルス株が、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．リケニフォルミス及びＢ．アミロリケファシエンスからなる群より選択される、請求項５１の変異バチルス株。
【請求項５３】
前記変異バチルス株がＢ．ズブチリス株である、請求項５２の変異バチルス株。

【請求項５４】
前記固有染色体領域がＰＢＳＸ領域、スキン領域、プロファージ７領域、ＳＰβ領域、プロファージ１領域、プロファージ２領域、プロファージ３領域、プロファージ４領域、プロファージ５領域、プロファージ６領域、ＰＰＳ領域、ＰＫＳ領域、ＹＶＦＦ－ＹＶＥＫ領域、ＤＨＢ領域及びそれらの断片からなる群より選択される、請求項５０の変異バチルス株。
【請求項５５】
２つの固有染色体領域またはそれらの断片が欠失している、請求項５０の変異バチルス株。
【請求項５６】
前記目的タンパク質がプロテアーゼである、請求項５０の変異バチルス株。
【請求項５７】
前記プロテアーゼがズブチリシンである、請求項５６の変異バチルス株。
【請求項５８】
前記ズブチリシンがズブチリシン１６８、ズブチリシンＢＰＮ’、ズブチリシン・カールスバーグ、ズブチリシンＤＹ、ズブチリシン１４７、及びズブチリシン３０９及びこれらの変異体からなる群より選択される、請求項５７の変異バチルス株。
【請求項５９】
前記バチルス宿主が組換え株である、請求項５０の変異バチルス株。
【請求項６０】
さらに、ｄｅｇＵ、ｄｅｇＱ、ｄｅｇＳ、ｓｃｏ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子に少なくとも１の変異を含む、請求項５０の変異バチルス株。
【請求項６１】
ＰＢＳＸ領域、スキン領域、プロファージ７領域、ＳＰβ領域、プロファージ１領域、プロファージ２領域、プロファージ３領域、プロファージ４領域、プロファージ５領域、プロファージ６領域、ＰＰＳ領域、ＰＫＳ領域、ＹＶＦＦ－ＹＶＥＫ領域、ＤＨＢ領域及びそれらの断片からなる群より選択される固有染色体領域の欠失を含むプロテアーゼ生成バチルス株。
【請求項６２】
前記プロテアーゼがズブチリシンである、請求項６１のプロテアーゼ生成バチルス株。
【請求項６３】
前記バチルスがＢ．ズブチリス株である、請求項６２のプロテアーゼ生成バチルス株。
【請求項６４】
前記プロテアーゼが異種プロテアーゼである、請求項６１のプロテアーゼ生成バチルス株。
【請求項６５】
バチルス中の目的タンパク質の発現を増大させる方法であって、
ａ）選択マーカー及び不活性化染色体断片を含むＤＮＡ構築体をバチルス宿主株内に導入する工程であって、前記ＤＮＡ構築体が前記バチルス宿主株の染色体内に導入され、前記バチルス宿主細胞の固有染色体領域またはそれらの断片の欠失を生じ、変異バチルス株を生成する工程；及び
ｂ）前記変異バチルス株を適した条件下で成長させる工程であって、ここで目的タンパク質の発現が変異していないバチルス宿主細胞内の目的タンパク質の発現と比較して変異バチルス株内のほうが大きい工程
を含む、当該方法。
【請求項６６】
前記目的タンパク質を回収する工程をさらに含む、請求項６５の方法。
【請求項６７】
前記選択マーカーを変異バチルス株から削除する工程をさらに含む、請求項６５の方法。
【請求項６８】

前記固有染色体領域がＰＢＳＸ、スキン、プロファージ７、ＳＰβ、プロファージ１、プロファージ２、プロファージ３、プロファージ４、プロファージ５、プロファージ６、ＰＰＳ、ＰＫＳ、ＹＶＦＦ－ＹＶＥＫ、ＤＨＢ及びそれらの断片からなる領域の群より選択される、請求項６５の方法。

【請求項６９】

前記変異バチルス株が少なくとも２つの固有染色体領域の欠失を含む、請求項６５の方法。

【請求項７０】

前記目的タンパク質が酵素である、請求項６５の方法。

【請求項７１】

前記バチルス宿主株が、Ｂ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される、請求項６５の方法。

【請求項７２】

請求項６５の方法を用いて生成した変異バチルス株。

【請求項７３】

バチルス株から目的タンパク質を得る方法であって、

ａ）選択マーカー及び不活性化染色体断片を含むＤＮＡ構築体を用いてバチルス宿主細胞を形質転換する工程であって、ここで前記ＤＮＡ構築体がバチルス株染色体内に統合され、固有染色体領域またはそれらの断片の欠失を生じ、変異バチルス株を生じる工程、

ｂ）目的タンパク質の発現が可能な適した条件下で変異バチルス株を培養する工程、及び

ｃ）目的タンパク質を回収する工程

を含む、当該方法。

【請求項７４】

目的タンパク質が酵素である、請求項７３の方法。

【請求項７５】

バチルス宿主が目的タンパク質をエンコードする異種遺伝子を含む、請求項７３の方法。

【請求項７６】

前記バチルス宿主細胞が、Ｂ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される、請求項７３の方法。

【請求項７７】

前記固有染色体領域がＰＢＳＸ、スキン、プロファージ７、ＳＰβ、プロファージ１、プロファージ２、プロファージ３、プロファージ４、プロファージ５、プロファージ６、ＰＰＳ、ＰＫＳ、ＹＶＦＦ－ＹＶＥＫ、ＤＨＢ及びそれらの断片からなる領域の群より選択される、請求項７３の方法。

【請求項７８】

前記変異バチルス株がさらに、ｄｅｇＵ、ｄｅｇＱ、ｄｅｇＳ、ｓｃｏ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子に少なくとも１の変異を含む、請求項７７の方法。

【請求項７９】

目的タンパク質がプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼからなる群より選択される酵素である、請求項７３の方法。

【請求項８０】

前記酵素がプロテアーゼである、請求項７９の方法。

【請求項８１】

バチルス中で目的タンパク質の発現を増大させる方法であって、
　ａ）少なくとも１のバチルス細胞から核酸を得る工程；
　ｂ）トランスクリプトームＤＮＡアレイ分析を前記バチルス細胞由来の核酸について行い、少なくとも１の目的遺伝子を同定する工程；
　ｃ）少なくとも１の前記目的遺伝子を修飾してＤＮＡ構築体を生成する工程；
　ｄ）前記ＤＮＡ構築体をバチルス宿主細胞内に導入して変異バチルス株を得る工程であって、ここで変異していないバチルス内での目的タンパク質発現と比較して前記目的タンパク質の発現が増大する条件下で前記変異バチルス株は目的タンパク質を生成できる当該工程
を含む、当該方法。
【請求項８２】
目的タンパク質がアミノ酸生合成経路及び生分解経路からなる群より選択される少なくとも１の生化学経路に関係する、請求項８１の方法。
【請求項８３】
前記生分解経路が前記目的遺伝子の転写により無効にされる、請求項８２の方法。
【請求項８４】
バチルス内で目的タンパク質の発現を増大する方法であって、
　ａ）少なくとも１のバチルス細胞から少なくとも１の目的遺伝子を含む核酸を得る工程；
　ｂ）前記核酸を断片化する工程；
　ｃ）前記断片を増幅して、少なくとも１の前記目的遺伝子を含む増幅断片プールを生成する工程；
　ｄ）前記増幅断片を連結してＤＮＡ構築体を生成する工程；
　ｅ）バチルス宿主細胞内に前記ＤＮＡ構築体を直接形質転換して変異バチルス株を生成する工程；
　ｆ）目的タンパク質の発現が変異してないバチルス内での目的タンパク質の発現と比較して増大する条件下で変異バチルス株を培養する工程
を含む、当該方法。
【請求項８５】
前記変異バチルス株がｐｒｐＣ、ｓｉｇＤ及びｔｄｈ／ｋｂｌからなる群より選択される修飾遺伝子を含む、請求項８４の方法。
【請求項８６】
配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号３７、配列番号２５、配列番号２１、配列番号５０、配列番号２３、配列番号２７、配列番号１９、配列番号３１、配列番号４８、配列番号４６、配列番号３５及び配列番号３３からなる群より選択される核酸配列に示される配列を含む単離核酸。
【請求項８７】
アミノ酸をエンコードする単離核酸配列であって、
当該アミノ酸が配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５１、配列番号３８、配列番号２６、配列番号２２、配列番号５７、配列番号２４、配列番号２８、配列番号２０、配列番号３２、配列番号５５、配列番号５３、配列番号３６及び配列番号３４からなる群より選択される、
当該単離核酸配列。
【請求項８８】
アミノ酸配列が配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５１、配列番号３８、配列番号２６、配列番号２

２、配列番号５７、配列番号２４、配列番号２８、配列番号２０、配列番号３２、配列番号５５、配列番号５３、配列番号３６及び配列番号３４からなる群より選択される、単離アミノ酸配列。

【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の分野
本発明は発現タンパク質を生成する能力を変化させるために遺伝子組換えした細胞を提供する。特に、本発明は、目的タンパク質の発現が増大したバチルス種などのグラム陽性細菌に関し、ここで１以上の染色体遺伝子が不活性化され、好ましくは１以上の染色体遺伝子がバチルス染色体から欠失される。いくつかの実施態様において、１以上の固有の染色体領域が対応する野生型バチルス宿主染色体から欠失される。
【０００２】
発明の背景
遺伝子工学は工業用生物反応器、細胞工場として、及び食物発酵において用いる微生物の向上を可能としてきた。特に、バチルス種は多数の有用なタンパク質及び代謝産物を生成及び分泌する（Ｚｕｋｏｗｓｋｉ、“Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｃｏｍｍｅｒｃｉａｌｌｙ　ｖａｌｕａｂｌｅ　ｐｒｏｄｕｃｔｓ（商業的に有用な産物の生成）”、Ｉｎ：Ｄｏｉ　ａｎｄ　ＭｃＧｌｏｕｇｌｉｎ（編集）Ｂｉｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｂａｃｈｉｌｌｉ：Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｔｏ　Ｉｎｄｕｓｔｒｙ，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈ－Ｈｅｉｎｅｍａｎｎ，Ｓｔｏｎｅｈａｍ．Ｍａｓｓ第３１１－３３７頁［１９９２］）。工業的に用いられる最も一般的なバチルス種はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．アミロリケファシエンス及びＢ．ズブチリスである。これらはＧＲＡＳ（通常、安全であると認識される）状態であるので、これらバチルス種株は食品及び医薬業界において利用されるタンパク質生成のもっともな候補である。重要な生成酵素はα－アミラーゼ、中性プロテアーゼ、及びアルカリ（またはセリン）プロテアーゼを含む。しかしながら、バチルス宿主細胞中におけるタンパク質生成の理解の進展にも関わらず、これらタンパク質の発現を増加させるための方法に関する必要性が以前としてある。
【０００３】
発明の概要
本発明は発現タンパク質を生成する能力を変化させるために遺伝子組換えした細胞を提供する。特に、本発明は、目的タンパク質の発現が増大したバチルス種などのグラム陽性細菌に関し、ここで１以上の染色体遺伝子が不活性化され、好ましくは１以上の染色体遺伝子がバチルス染色体から欠失される。いくつかの実施態様において、１以上の固有の染色体領域が対応する野生型バチルス宿主染色体から欠失される。いくつかの好ましい実施態様において、本発明は、バチルスにおける目的タンパク質の発現及び／または分泌を向上させる方法及び組成物を提供する。
【０００４】
特に好ましい実施態様において、本発明はバチルスにおける目的タンパク質の発現及び／または分泌を向上させる手段を提供する。より具体的には、これらの実施態様において、本発明はバチルス宿主株における１以上の染色体遺伝子の不活性化に関し、ここで不活化遺伝子は株の生存に必須のものではない。１以上の染色体遺伝子を不活化した結果、変化したバチルス株が生成され、対応する変化していないバチルス宿主株よりも高いレベルの目的タンパク質を発現することができる。
【０００５】
さらに、別の実施態様において、本発明はバチルス宿主株における大きな領域の染色体ＤＮＡを除去する手段を提供し、ここで欠失された固有染色体領域は株生成に必須のもの

ではない。１以上の固有染色体領域を除去した結果、変化したバチルス株が生成され、対応する変化していないバチルス宿主株よりも高いレベルの目的タンパク質を発現することができる。いくつかの好ましい実施態様において、バチルス宿主株は目的タンパク質をエンコードするポリヌクレオチドを含む組換え宿主株である。特に好ましい実施態様において、変異バチルス株はＢ．ズブチリス株である。下記に詳細に説明するように、欠失固有染色体領域は、限定されないが、プロファージ領域、抗菌（例えば、抗生物質）領域、調節領域、複数隣接単一遺伝子（ｍｕｌｔｉ－ｃｏｎｔｉｇｕｏｕｓ　ｓｉｎｇｌｅ　ｇｅｎｅ）領域及びオペロン領域を含む。

【０００６】

いくつかの実施態様において、本発明はバチルス細胞由来の目的タンパク質発現を増大させる方法及び組成物を提供する。いくつかの好ましい実施態様において、本方法はバチルス宿主株におけるｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される１以上の染色体遺伝子を不活性させて変異バチルス株を生成する工程；変異バチルス株を適当な成長条件下で成長させる工程；及び目的タンパク質を変異バチルス中で発現させる工程を含み、ここでタンパク質発現は対応する非変異バチルス宿主株と比較して増大している。いくつかの実施態様において、目的タンパク質は相同タンパク質であり、一方、他の実施態様において、目的タンパク質は異種タンパク質である。いくつかの実施態様において、１以上の目的タンパク質が生成される。いくつかの好ましい実施態様において、バチルス種はＢ．ズブチリス株である。さらなる実施態様において、染色体遺伝子の不活性化は遺伝子の欠失を含み、変異バチルス株を生成する。さらなる実施態様において、染色体遺伝子の不活性化は挿入不活性化を含む。いくつかの好ましい実施態様において。目的タンパク質は酵素である。いくつかの実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼから選択され、他の実施態様において、目的タンパク質は抗体、ホルモン及び成長因子からなる群より選択される。

【０００７】

さらに別の実施態様において、本発明は変異バチルス株を提供し、ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤの群より選択される１以上染色体遺伝子の欠失を含む。いくつかの実施態様において、変異株はプロテアーゼ生成バチルス株である。別の実施態様において、変異バチルス株はズブチリシン生成株である。さらに別の実施態様において、変異バチルス株はさらにｄｅｇＵ、ｄｅｇＱ、ｄｅｇＳ、ｓｃｏＣ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子の変異を含む。

【０００８】

さらなる実施態様において、本発明は入来配列（ｉｎｃｏｍｉｎｇ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）を含むＤＮＡ構築体を提供する。いくつかの実施態様において、入来配列は、選択マーカー及びｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される遺伝子または遺伝子断片を含む。別の実施態様において、選択マーカーは遺伝子の２つの断片間に位置する。他の実施態様において、入来配列は選択マーカー及び相同ボックス（ｈｏｍｏｌｏｇｙ　ｂｏｘ）を含み、ここで相同ボックスはマーカーの５’及び／または３’末端の側面に位置する。別の実施態様において、宿主細胞ＤＮＡ構築体を用いて形質転換される。さらなる実施態様において宿主細胞は大腸菌またはバチルス細胞である。いくつかの好まし

い実施態様において、ＤＮＡ構築体は宿主細胞内の染色体上に統合される。
【０００９】
本発明は、目的タンパク質を発現する変異バチルス株を得る方法も提供し、本発明のＤＮＡ構築体を含むバチルス宿主細胞を形質転換する工程を含み、ここでＤＮＡ構築体はバチルス宿主細胞の染色体中に統合され；変異バチルス株を生成する工程であって、１以上の染色体遺伝子が不活性される工程；及び目的タンパク質発現のための適当な成長条件下で変異バチルス株を成長させる工程を含む。いくつかの実施態様において、目的タンパク質は、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼから選択され、他の実施態様において、目的タンパク質は抗体、ホルモン及び成長因子からなる群より選択される。さらに別の実施態様において、バチルス宿主株はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．チューリンゲンシス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．メガテリウム及び好ましくはＢ．ズブチリスからなる群より選択される。いくつかの実施態様において、バチルス宿主株は組換え宿主である。さらに別の実施態様において、目的タンパク質を回収する。さらなる実施態様において、選択マーカーは変異バチルスから切除される。
【００１０】
本発明はさらに目的タンパク質を発現する変異バチルス株を得る方法を提供する。いくつかの実施態様において、本方法は入来配列を含むＤＮＡ構築体を含むバチルス宿主細胞を形質転換する工程を含み、ここで入来配列は選択マーカー及びｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される遺伝子を含み、ここでＤＮＡ構築体はバチルス宿主細胞の染色体内に統合され、１以上の遺伝子欠失を生じ；変異バチルス株を得る工程及び変異バチルス株を目的タンパク質の発現に適した成長条件下で成長させる工程を含む。
【００１１】
いくつかの実施態様において、本発明は入来配列を含むＤＮＡ構築体を提供し、ここで入来配列は選択マーカー、及びｃｓｓＳ遺伝子、ｃｓｓＳ遺伝子断片またはそれに相同な配列を含む。いくつかの実施態様において、選択マーカーは当該遺伝子の２つの断片間に位置する。別の実施態様において、入来配列は選択マーカー及び相同ボックスを含み、ここで相同ボックスはマーカーの５’及び／または３’末端の側面に位置する。さらに別の実施態様において、宿主細胞はＤＮＡ構築体を用いて形質転換される。別の実施態様において、宿主細胞は大腸菌またはバチルス細胞である。さらに別の実施態様において、ＤＮＡ構築体は宿主細胞の染色体上に統合される。
【００１２】
また、本発明はプロテアーゼ生成が増大したバチルス・ズブチリス株を得る方法を提供する。いくつかの実施態様において、本方法は、、本発明に従うＤＮＡ構築体を用いてバチルス・ズブチリス宿主細胞を形質転換する工程；ＤＮＡ構築体とバチルス染色体の相同領域を相同組換えさせる工程であって、少なくとも１の以下の遺伝子がバチルス染色体から欠失される工程、ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤ；変異バチルス・ズブチリス株を得る工程；及びプロテアーゼ発現に適した条件下で変異バチルス株を成長させる工程を含む。いくつかの実施態様において、プロテアーゼ生成バチルスはズブチリシン生成株である。別の実施態様において、プロテアーゼは異種プロテアーゼである。別の実施態様において、プロテアーゼ生成株は、ｄｅｇＵ、ｄｅｇＱ、ｄｅｇＳ、ｓｃｏＣ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子の変異をさらに含む。いくつかの実施

態様において、本発明は遺伝子の挿入不活性化を含む。

【００１３】

本発明はさらにｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される１以上の染色体遺伝子の欠失を含む変異バチルス・ズブチリス株を提供し、ここで変異バチルス・ズブチリス株は目的タンパク質を発現することが可能である。いくつかの実施態様において、目的タンパク質は酵素である。いくつかの別の実施態様において、目的タンパク質は異種タンパク質である。

【００１４】

いくつかの実施態様において、本発明は１以上の固有染色体領域またはそれらの断片の欠失を含む変異バチルス株を提供し、固有染色体領域は約０．５～５００キロ塩基（ｋｂ）を含み、及びここで変異バチルス株は本質的に同じ成長条件下で成長させた場合、対応する非変異バチルス株と比較して増大したレベルの目的タンパク質発現を有する。

【００１５】

さらに別の実施態様において、本発明は、ＰＢＳＸ領域、スキン領域、プロファージ７領域、ＳＰβ領域、プロファージ１領域、プロファージ２領域、プロファージ３領域、プロファージ４領域、プロファージ５領域、プロファージ６領域、ＰＰＳ領域、ＰＫＳ領域、ｙｖｆＦ－ｙｖｅＫ領域、ＤＨＢ領域及びそれらの断片からなる群より選択される固有染色体領域の少なくとも１の欠失を含むプロテアーゼ生成バチルス株を提供する。

【００１６】

さらなる実施態様において、本発明はバチルスにおいて目的タンパク質の発現を増大させる方法を提供し、以下を含む：選択マーカーを含むＤＮＡ構築体を導入し、及びバチルス宿主株内の染色体断片を不活性化させることにより生成した変異バチルス株を得る工程あって、ここでＤＮＡ構築体はバチルス染色体内に統合され、バチルス宿主細胞由来の固有染色体領域またはそれらの断片の欠失を生じる工程；及び成長に適した条件下で変異バチルスを成長させる工程であって、ここで目的タンパク質の発現は変異バチルス株において対応する非変異バチルス宿主細胞の目的タンパク質の発現と比較して大きい。

【００１７】

また、本発明はバチルス株から目的タンパク質を得る方法を提供し、以下の工程を含む：選択マーカーを含むＤＮＡ構築体を用いてバチルス宿主細胞を形質転換し、染色体断片を不活性化する工程であって、ここでＤＮＡ構築体はバチルス株の染色体内に統合され、固有染色体領域またはそれらの断片の欠失を生じて変異バチルス株を形成する工程；目的タンパク質が発現できるように適した成長条件下で変異バチルス株を培養する工程；及び目的タンパク質を回収する工程。

【００１８】

また、本発明は、有益な変異をスクリーン及び／または同定するためにＤＮＡマイクロアレイデータを使用する手段を提供する。いくつかの好ましい実施態様において、これらの変異はｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される遺伝子に関する。いくつかの好ましい実施態様において、これらの有益な変異は所定のアミノ酸生合成経路及び生分解経路の同時発現に関するトランスクリプトーム証拠及び／または分解経路の欠失がより良い性能の株を生じるという証拠及び／または生合成経路の過剰発現がより良い性能の株を生じるという証拠に基づく。別の実施態様において、本発明は有益な変異を提供するためにＤＮＡマイクロアレイデータを使用する手段を提供する。いくつかの好ましい実施態様において、これらの変異はｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される遺伝子に関し、アミノ酸生合成経路を含む遺伝子由来のｍＲＮＡの発現がバランスが取れていない場合、全体的な経路の過剰発現は親（

すなわち野生型及び／または最初の）株よりも優れた性能の株を提供する。さらに、本発明は糖新生遺伝子の不活性化により株生成を向上させる手段を提供する。これらの好ましい実施態様のいくつかにおいて、不活化糖新生遺伝子はｐｃｋＡ、ｇａｐＢ及びｆｂｐからなる群より選択される。

【００１９】

本発明はバチルスから目的タンパク質の発現を増大させる方法を提供し、以下の工程を含む：目的タンパク質を生成できる変異バチルス株を得る工程であって、変異バチルス株はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される少なくとも２の不活化染色体遺伝子を有する工程、及び変異バチルス株を目的タンパク質が変異バチルス株により発現される条件下で成長させる工程であって、目的タンパク質の発現が非変異バチルス宿主株における目的タンパク質の発現と比較して増大している工程。いくつかの実施態様において、目的タンパク質は、相同タンパク質及び異種タンパク質からなる群より選択される。いくつかの実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼから選択され、他の実施態様において、目的タンパク質は抗体、ホルモン及び成長因子からなる群より選択される。いくつかの特に好ましい実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼである。さらに別の実施態様において、変異バチルス株はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される１以上の染色体遺伝子を欠失することにより得られる。

【００２０】

また、本発明はここに記載する方法を用いて得られる変異バチルス株も提供する。好ましい実施態様において、変異バチルス株はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される１以上の遺伝子の染色体欠失を含む。いくつかの実施態様において、これらの染色体遺伝子の１以上が欠失される。特に好ましい実施態様において、変異株はＢ．ズブチリス株である。別の好ましい実施態様において、変異バチルス株はプロテアーゼ生成株である。いくつかの特に好ましい実施態様において、プロテアーゼはズブチリシンである。さらに別の実施態様において、ズブチリシンはズブチリシン１６８、ズブチリシンＢＰＮ’、ズブチリシン・カールスバーグ、ズブチリシンＤＹ、ズブチリシン１４７、ズブチリシン３０９及びこれらの変異体からなる群より選択される。さらに別の実施態様において、変異バチルス株はｄｅｇＵ、ｄｅｇＱ、ｄｅｇＳ、ｓｃｏＣ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される少なくとも１の遺伝子において変異をさらに含む。特に好ましい実施態様において、変異バチルス株はさらに目的の異種タンパク質を含む。

【００２１】

また、本発明はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤ、それらの遺伝子断片及びそれらの相同配列からなる群より選択される少なくとも１の遺伝子を含むＤＮＡ構築体を提供する。いくつかの好ましい実施態様において、ＤＮＡ構築体は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配

列番号１７、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号３７、配列番号２５、配列番号２１、配列番号５０、配列番号２９、配列番号２３、配列番号２７、配列番号１９、配列番号３１、配列番号４８、配列番号４６、配列番号３５及び配列番号３３からなる群より選択される少なくとも１の核酸配列を含む。いくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体はさらに少なくとも１の目的タンパク質をエンコードする少なくとも１のポリヌクレオチド配列を含む。

【００２２】

本発明はＤＮＡ構築体を含むプラスミドも提供する。さらなる実施態様において、本発明はＤＮＡ構築体を含むプラスミドを含んだ宿主細胞を提供する。いくつかの実施態様において、宿主細胞はバチルス細胞及び大腸菌細胞からなる群より選択される。いくつかの好ましい実施態様において、宿主細胞はＢ．ズブチリスである。特に好ましい実施態様において、ＤＮＡ構築体は宿主細胞の染色体内に統合される。別の実施態様において、ＤＮＡ構築体は、配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号１８、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５１、配列番号３８、配列番号２６、配列番号２２、配列番号５７、配列番号３０、配列番号２４、配列番号２８、配列番号２０、配列番号３２、配列番号５５、配列番号５３、配列番号３６及び配列番号３４からなる群より選択される少なくとも１のアミノ酸配列をエンコードする少なくとも１の遺伝子を含む。別の実施態様において、ＤＮＡ構築体はさらに少なくとも１の選択マーカーを含み、ここで選択マーカーは当該遺伝子配列またはそれに相同な遺伝子配列の断片の両側に位置する。

【００２３】

本発明は入来配列を含むＤＮＡ構築体も提供し、ここで入来配列は目的タンパク質をエンコードする核酸及び相同ボックスを含む両側に位置する選択マーカーを含み、相同ボックスはｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される少なくとも１の遺伝子のコード領域のすぐ隣に位置する配列に対して８０～１００％配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体は遺伝子のコード配列の側面に位置する少なくとも１の核酸をさらに含む。本発明はＤＮＡ構築体を含むプラスミドも提供する。さらなる実施態様において、本発明はＤＮＡ構築体を含むプラスミドを含む宿主細胞を提供する。いくつかの実施態様において、宿主細胞はバチルス細胞及び大腸菌細胞からなる群より選択される。いくつかの好ましい実施態様において、宿主細胞はＢ．ズブチリスである。いくつかの特に好ましい実施態様において、ＤＮＡ構築体は宿主細胞の染色体内に統合される。別の好ましい実施態様において、選択マーカーは宿主細胞染色体から切除される。

【００２４】

本発明はプロテアーゼ生成が増大した変異バチルス株を得るための方法をさらに提供し、以下を含む：少なくとも１の本発明のＤＮＡ構築体を含むバチルス宿主細胞を形質転換する工程であって、ＤＮＡ構築体中の目的タンパク質がプロテアーゼであり、ＤＮＡ構築体が少なくとも１の遺伝子が変異バチルス株を生成するために不活性化される条件下でバチルス宿主細胞染色体内に統合され；及び増大したプロテアーゼ生成が得られる条件下で変異バチルス株を成長させる工程。いくつかの特に好ましい実施態様において、本方法はプロテアーゼを回収する工程をさらに含む。別の好ましい実施態様において、少なくとも１の不活化遺伝子は変異バチルス株の染色体から欠失される。本発明はここに記載される方法を用いて生成した変異バチルス株も提供する。いくつかの実施態様において、バチルス宿主株はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．ロータス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．メ

ガテリウム及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される。いくつかの好ましい実施態様において、バチルス宿主細胞はＢ．ズブチリスである。

【００２５】

本発明は変異バチルスにおいてプロテアーゼ発現を増大させる方法も提供し、以下を含む：本発明のＤＮＡ構築体を用いてバチルス宿主細胞を形質転換させる工程；ＤＮＡ構築体とバチルス宿主細胞の染色体領域を相同組換えさせる工程であって、バチルス宿主細胞の少なくとも１の染色体遺伝子が不活性化され、変異バチルス株を生成する工程；及びプロテアーゼ発現に適した条件下で変異バチルス株を成長させる工程であって、ここでプロテアーゼ生成は形質転換前のバチルス・ズブチリス宿主と比較して変異バチルス・ズブチリス株が大きい。いくつかの好ましい実施態様において、プロテアーゼはズブチリシンである。別の実施態様において、プロテアーゼは組換えプロテアーゼである。さらに別の実施態様において、不活性化は少なくとも１の遺伝子の欠失により達成される。さらに別の実施態様において、不活性化は少なくとも１の遺伝子の挿入不活性化による。本発明はここに記載の方法を用いて得た変異バチルス株も提供する。いくつかの実施態様において、変異バチルス株はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される少なくとも１の不活性化遺伝子を含む。いくつかの好ましい実施態様において、不活性化遺伝子は欠失により不活性化される。別の実施態様において、変異バチルス株はｄｅｇＵ、ｄｅｇＳ、ｄｅｇＱ、ｓｃｏＣ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子に少なくとも１の変異を含む。いくつかの好ましい実施態様において、変異はｄｅｇＵ（Ｈｙ）３２である。さらに別の実施態様において、株は組換えプロテアーゼ生成株である。いくつかの好ましい実施態様において、変異バチルス株はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．ロータス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．メガテリウム及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される。

【００２６】

本発明は１以上の固有染色体領域またはその断片を含む変異バチルス株も提供し、ここで固有染色体領域は約０．５～５００ｋｂを含み、変異バチルス株は変異及び非変異バチルス株を本質的に同じ成長条件下で成長させた場合、対応する非変異バチルス株と比較して目的タンパク質の発現が増大している。好ましい実施態様において、変異バチルス株はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．ロータス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．メガテリウム及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される。いくつかの好ましい実施態様において、変異バチルス株はＢ．ズブチリス、Ｂ．リケニフォルミ及びＢ．アミロリケファシエンスからなる群より選択される。いくつかの特に好ましい実施態様において、変異バチルス株はＢ．ズブチリス株である。さらに別の実施態様において、固有染色体領域はＰＢＳＸ領域、スキン領域、プロファージ７領域、ＳＰβ領域、プロファージ１領域、プロファージ２領域、プロファージ３領域、プロファージ４領域、プロファージ５領域、プロファージ６領域、ＰＰＳ領域、ＰＫＳ領域、ＹＶＥＦ－ＹＶＥＫ領域、ＤＨＢ領域及びそれらの断片からなる群より選択される。いくつかの好ましい実施態様において、２つの固有染色体領域またはその断片は欠失される。いくつかの実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼから選択され、他の実施態様において、目的タンパク質は抗体、ホルモン及び成長因子からなる群より選択される。さらに別の実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼである。いくつかの好ましい実施態様において、プロテアーゼはズブチリシンである。いくつかの特に好ましい実施態様に

おいて、ズブチリシンはズブチリシン１６８、ズブチリシンＢＰＮ’、ズブチリシン・カールスバーグ、ズブチリシンＤＹ、ズブチリシン１４７、及びズブチリシン３０９及びこれらの変異体からなる群より選択される。さらに好ましい実施態様において、バチルス宿主は組換え体株である。いくつかの特に好ましい実施態様において、変異バチルス株は、ｄｅｇＵ、ｄｅｇＱ、ｄｅｇＳ、ｓｃｏ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子において少なくとも１の変異をさらに含む。いくつかの好ましい実施態様において、変異はｄｅｇＵ（Ｈｙ）３２でる。

【００２７】

本発明はＰＢＳＸ領域、スキン領域、プロファージ７領域、ＳＰβ領域、プロファージ１領域、プロファージ２領域、プロファージ３領域、プロファージ４領域、プロファージ５領域、プロファージ６領域、ＰＰＳ領域、ＰＫＳ領域、ＹＶＦＦ－ＹＶＥＫ領域、ＤＨＢ領域及びそれらの断片からなる群より選択される固有染色体領域の欠失を含むプロテアーゼ生成バチルス株をさらに提供する。いくつかの好ましい実施態様において、プロテアーゼはズブチリシンである。いくつかの実施態様において、プロテアーゼは異種プロテアーゼである。いくつかの好ましい実施態様において、変異バチルス株はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．ロータス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．メガテリウム及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される。別の実施態様において、バチルス株はＢ．ズブチリス株である。

【００２８】

本発明はバチルスにおいて目的タンパク質の発現を増大する方法も提供し、以下を含む：選択マーカー及び不活性化染色体断片を含むＤＮＡ構築体をバチルス宿主株内に導入する工程であって、ここでＤＮＡ構築体をバチルス宿主株の染色体内に統合し、バチルス宿主細胞から固有染色体領域またはその断片の欠失を生じて変異バチルス株を生じる工程；及び適当な条件下で変異バチルス株を成長させる工程であって、ここで目的タンパク質発現は変異していないバチルス宿主細胞における目的タンパク質の発現と比較して変異バチルス株が大きい。いくつかの好ましい実施態様において、本方法は目的タンパク質を回収する工程をさらに含む。いくつかの実施態様において、本方法は変異バチルス株から選択マーカーを切除する工程をさらに含む。別の実施態様において、固有染色体領域はＰＢＳＸ領域、スキン領域、プロファージ７領域、ＳＰβ領域、プロファージ１領域、プロファージ２領域、プロファージ３領域、プロファージ４領域、プロファージ５領域、プロファージ６領域、ＰＰＳ領域、ＰＫＳ領域、ＹＶＦＦ－ＹＶＥＫ領域、ＤＨＢ及びそれらの断片からなる領域の群より選択される。さらに別の実施態様において、変異バチルス株は少なくとも２の固有染色体領域の欠失を含む。いくつかの好ましい実施態様において、目的タンパク質は酵素である。いくつかの実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼから選択され、他の実施態様において、目的タンパク質は抗体、ホルモン及び成長因子からなる群より選択される。いくつかの実施態様において、バチルス宿主株はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される。本発明はここに記載の方法を用いて生成した変異バチルス株も提供する。

【００２９】

本発明はバチルス株から目的タンパク質を得る方法も提供し、以下を含む：選択マーカー及び不活性化染色体断片を含むＤＮＡ構築体を用いてバチルス宿主細胞を形質転換する工程であって、ここでＤＮＡ構築体はバチルス株の染色体内に統合され、固有染色体領域またはその断片の欠失を生じ、変異バチルス株を生成し、目的タンパク質の発現を可能にするのに適した条件下で変異バチルス株を培養する工程及び目的タンパク質を回収する工

程。いくつかの好ましい実施態様において、目的タンパク質は酵素である。いくつかの特に好ましい実施態様において、バチルス宿主は目的タンパク質をエンコードする異種遺伝子を含む。別の実施態様において、バチルス宿主細胞はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される。いくつかの好ましい実施態様において、固有染色体領域はＰＢＳＸ、スキン、プロファージ７、ＳＰβ、プロファージ１、プロファージ２、プロファージ３、プロファージ４、プロファージ５、プロファージ６、ＰＰＳ、ＰＫＳ、ＹＶＦＦ－ＹＶＥＫ、ＤＨＢ及びそれらの断片からなる群より選択される。いくつかの特に好ましい実施態様において、変異バチルス株はｄｅｇＵ、ｄｅｇＱ、ｄｅｇＳ、ｓｃｏ４、ｓｐｏｌｌＥ及びｏｐｐＡからなる群より選択される遺伝子において少なくとも１の変異をさらに含む。いくつかの実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼからなる群より選択される酵素である。いくつかの特に好ましい実施態様において、当該酵素はプロテアーゼである。いくつかの好ましい実施態様において、目的タンパク質は酵素である。別の実施態様において、目的タンパク質は抗体、ホルモン及び成長因子からなる群より選択される。

【００３０】

本発明はバチルスにおいて目的タンパク質の発現を増大させる方法をさらに提供し、以下を含む：少なくとも１のバチルス細胞から核酸を得る工程；前記バチルス細胞由来核酸についてトランスクリプトームＤＮＡアレイ分析を行い、少なくとも１の目的遺伝子を同定する工程；ＤＮＡ構築体を生成するために少なくとも１の目的遺伝子を修飾する工程；ＤＮＡ構築体をバチルス宿主細胞内に導入して変異バチルス株を生成する工程であって、ここで変異体は目的タンパク質発現が非変異のバチルスにおける目的タンパク質の発現と比較して増大するような条件下で目的タンパク質を生成することができる。いくつかの実施態様において、目的タンパク質はアミノ酸生合成経路及び生分解経路からなる群より選択される少なくとも１の生化学経路に関係する。いくつかの実施態様において、本方法は少なくとも１の生分解経路を無効にすることを含む。いくつかの実施態様において、生分解経路は目的遺伝子の転写により無効にされる。しかしながら、本発明はこれらの経路に限定されるものではなく、本方法は目的タンパク質の発現の増加が生じるように細胞内のその他の生化学経路の修飾においても使用できることが考えられる。いくつかの特に好ましい実施態様において、バチルス宿主は目的タンパク質をエンコードする異種遺伝子を含む。別の実施態様において、バチルス宿主細胞はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される。いくつかの実施態様において、目的タンパク質は酵素である。いくつかの好ましい実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼから選択され、他の実施態様において、目的タンパク質は抗体、ホルモン及び成長因子からなる群より選択される。

【００３１】

本発明はバチルス中において目的タンパク質の発現を増大させる方法をさらに提供し、以下を含む：少なくとも１のバチルス細胞から少なくとも１の目的遺伝子を含む核酸を得る工程；前記核酸を断片化する工程；前記少なくとも１の目的遺伝子を含む増殖断片プールを生成するために前記断片を増殖する工程；前記増殖断片をＤＮＡ構築体を生成するために連結する工程；前記ＤＮＡ構築体をバチルス宿主細胞内に直接形質転換し、変異バチルス株を生成する工程；変異されていないバチルスにおける前記目的タンパク質の発現と比較して前記目的タンパク質の発現が増大するような条件下で前記変異バチルス株を培養

する工程。いくつかの好ましい実施態様において、前記増殖はポリメラーゼ連鎖反応を用いることを含む。いくつかの実施態様において、変異バチルス株はｐｒｐＣ、ｓｉｇＤ及びｔｄｈ／ｋｂｌからなる群より選択される修飾遺伝子を含む。いくつかの特に好ましい実施態様において、バチルス宿主は目的タンパク質をエンコードする異種遺伝子を含む。別の実施態様において、バチルス宿主細胞はＢ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス及びＢ．チューリンゲンシスからなる群より選択される。いくつかの実施態様において、目的タンパク質は酵素である。いくつかの好ましい実施態様において、目的タンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼから選択され、他の実施態様において、目的タンパク質は抗体、ホルモン及び成長因子からなる群より選択される。

【００３２】

本発明はさらに配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号３７、配列番号２５、配列番号２１、配列番号５０、配列番号２３、配列番号２７、配列番号１９、配列番号３１、配列番号４８、配列番号４６、配列番号３５及び配列番号３３からなる群より選択される核酸配列に示す配列を含む単離核酸をさらに提供する。

【００３３】

また、本発明はアミノ酸をエンコードする単離核酸配列を提供し、ここで当該アミノ酸は配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５１、配列番号３８、配列番号２６、配列番号２２、配列番号５７、配列番号２４、配列番号２８、配列番号２０、配列番号３２、配列番号５５、配列番号５３、配列番号３６及び配列番号３４からなる群より選択される。

【００３４】

本発明はさらに単離アミノ酸配列を提供し、当該アミノ酸は配列番号２、配列番号４、配列番号６、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５１、配列番号３８、配列番号２６、配列番号２２、配列番号５７、配列番号２４、配列番号２８、配列番号２０、配列番号３２、配列番号５５、配列番号５３、配列番号３６及び配列番号３４からなる群より選択される。

【００３５】

発明の説明

本発明は発現タンパク質を生成する能力を変化させるために遺伝子組換えした細胞を提供する。特に、本発明は、目的タンパク質の発現が増大したバチルス種などのグラム陽性細菌に関し、ここで１以上の染色体遺伝子が不活性化され、または修飾される。好ましい実施態様において、１以上の染色体遺伝子がバチルス染色体から欠失される。いくつかの実施態様において、１以上の固有の染色体領域が対応する野生型バチルス宿主染色体から欠失される。

【００３６】

定義

ここで言及する全ての特許及び文献、並びに当該特許及び文献に開示される全ての配列はここに明示的に引用するものとする。別に定めない限り、ここで用いる全ての技術及び科学的用語は本発明が属する当業者に通常理解される意味と同じ意味を有する（例えば、Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，第2版、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，ニューヨーク［１９９４］；及びＨａｌｅ ａｎｄ Ｍａｒｈａｍ、Ｔｈｅ Ｈａｒｐｅｒ Ｃｏｌｌｉｎｓ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇ

ｙ，Ｈａｒｐｅｒ　Ｐｅｒｅｎｎｉａｌ，ＮＹ［１９９１］を参照、これらはここで用いる多くの用語の当業者の一般的な辞書となる）。ここに記載の方法及び材料に類似または同等のいかなる方法及び材料も本発明を実施または試験するために用いることができるが、好ましい方法及び材料を記載する。数値範囲はその範囲を定める数字を含むものとする。明細書及び請求の範囲で用いるように、文脈において明らかに示される場合を除いて、単数の記載は複数も含むものとする。従って、例えば“宿主細胞”への言及は複数の当該宿主細胞も含む。

【００３７】

別に示さない限り、核酸は５’から３’の左から右方向に記載し、アミノ酸配列はアミノからカルボキシの左から右方向にそれぞれ記載する。ここに記載する見出しは本発明の種々の側面または実施態様を限定するものではなく、明細書全体に対して参照され得るものである。従って、下記に定義する用語は明細書全体を参照することによりさらに十分に定義されるものである。

【００３８】

ここで用いる、“宿主細胞”とは新しく導入するＤＮＡ配列のための宿主または発現媒体として作用する能力を有する細胞をいう。本発明の好ましい実施態様において、宿主細胞はバチルス種または大腸菌細胞である。

【００３９】

ここで用いる“バチルス属”とは、当業者に公知の“バチルス”属に含まれるすべての種類を含み、限定されないが、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．クラウジイ、Ｂ．ハロデュランス、Ｂ．メガテリウム、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．ロータス、及びＢ．チューリンゲンシスが挙げられる。バチルス属は分類上再編成を受け続けている。従って、当該属は再分類された種も含むものとし、限定されないが、現在は“ゲオバチルス・ステロサーモフィラス”と呼ばれるＢ．ステロサーモフィラスなどの微生物を含む。酸素存在下での耐性内生胞子の生成はバチルス属の重要な特徴と考えられるが、この特徴は最近ではアリシクロバチルス、アンフィバチルス（ａｍｐｈｉｂａｃｉｌｌｕｓ）、アニューリーニバチルス（ａｎｅｕｒｉｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ）、アノキシバチルス（ａｎｏｘｙｂａｃｉｌｌｕｓ）、ブレビバチルス、フィロバチルス、グラシリバチルス（Ｇｒａｃｉｌｉｂａｃｉｌｌｕｓ）、ハロバチルス、ペニバチルス、サリバチルス、サーモバチルス、ウレーバチルス（Ｕｒｅｉｂａｃｉｌｌｕｓ）及びヴァージバチルス（Ｖｉｒｇｉｂａｃｉｌｌｕｓ）と称されるものにも当てはまる。

【００４０】

ここで用いる、“核酸”の語はヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列及びそれらの断片または部分、及びセンスまたはアンチセンスストランドのいずれを表すかにかかわらず、２本鎖または１本鎖のゲノムまたは合成起源のＤＮＡ、ｃＤＮＡ及びＲＮＡをいう。遺伝子コードの縮退の結果、多数のヌクレオチド配列が所定のタンパク質をエンコードすることは当然理解されるであろう。

【００４１】

ここで用いる、“遺伝子”の語はポリペプチド鎖の生成に関するＤＮＡの染色体断片を意味し、コード領域（例えば、５’非翻訳（５’ＵＴＲ）またはリーダー配列及び３’非翻訳（３’ＵＴＲ）またはトレーラー配列）に先行または後に続く領域、及び個々のコード断片（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含んでも含まなくてもよい。

【００４２】

いくつかの実施態様において、遺伝子は治療的に重要なタンパク質またはペプチド、例えば成長因子、サイトカイン、配位子、受容体及び阻害物質、並びにワクチン及び抗体などをエンコードする。遺伝子は商業的に重要な工業タンパク質またはペプチド、例えば酵素（例えば、プロテアーゼ、アミラーゼ及びグルコアミラーゼなどのカルボヒドラーゼ、セルラーゼ、オキシダーゼ及びリパーゼ）もエンコードし得る。しかしながら、本発明は

特定の酵素またはタンパク質に限定されるものではない。いくつかの実施態様において、目的遺伝子は天然遺伝子であり、一方、他の実施態様において、変異遺伝子または合成遺伝子である。

【００４３】

ここで用いる“ベクター”の語は、細胞内で複製でき、新しい遺伝子またはＤＮＡ断片を細胞内に運ぶことができる核酸をいう。従って、当該用語は異なる宿主細胞間を移動するために設計された核酸構築体をいう。“発現ベクター”とは、外来細胞中に異種ＤＮＡ断片を導入し、発現できるベクターをいう。多くの原核及び真核発現ベクターは市販されている。適当な発現ベクターの選択は当業者の知識の範囲内である。

【００４４】

ここで用いる、“ＤＮＡ構築体”、“発現カセット”及び“発現ベクター”の語は標的細胞中で特定の核酸の転写を可能とする、一連の具体的な核酸成分を用いて組換えにより、または合成的に生成した核酸構築体をいう（すなわち、これらは上述のベクターまたはベクター成分である）。組換え発現カセットはプラスミド、染色体、ミトコンドリアＤＮＡ、色素体ＤＮＡ、ウイルスまたは核酸断片内に組み込むことができる。通常、発現ベクターの組換え発現カセット部分は、数ある配列の中でも、転写される核酸配列及びプロモーターを含む。いくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体は標的細胞中で特定の核酸の転写を可能とする一連の特定核酸成分も含む。１の実施態様において、本発明のＤＮＡ構築体はここで定義する選択マーカー及び不活性化染色体断片を含む。

【００４５】

ここで用いる“形質転換ＤＮＡ”、“形質転換配列”及び“ＤＮＡ構築体”とは、配列を宿主細胞または微生物内に導入するために用いられるＤＮＡをいう。形質転換ＤＮＡはＰＣＲまたはその他の適当な技術によりｉｎ　ｖｉｔｒｏで生成できる。いくつかの好ましい実施態様において、形質転換ＤＮＡは入来配列を含み、一方、他の好ましい実施態様において、さらに相同ボックスの側面に位置する入来配列を含む。さらに別の実施態様において、形質転換ＤＮＡはその他の非相同配列を含み。末端に加えられる（すなわち、ｓｔｕｆｆｅｒ配列またはフランキング配列）。末端は、例えばベクター内への挿入など形質転換ＤＮＡが閉じた環を形成するように閉じることができる。

【００４６】

ここで用いる、“プラスミド”の語はクローニングベクターとして用いる環状２本鎖（ｄｓ）ＤＮＡ構築体をいい、多くの細菌及びいくつかの真核生物内において染色体外自己複製遺伝子要素を形成する。いくつかの実施態様において、プラスミドは宿主細胞のゲノム内に組み込まれるようになる。

【００４７】

ここで用いる“単離”及び“精製”の語は、天然に結合している少なくとも１の成分から取り除いた核酸またはアミノ酸（またはその他の成分）をいう。

【００４８】

ここで用いる“発現の増大”とは、目的タンパク質生成の増大を含むように広く解釈される。発現の増大とは、ここでの記載に従った変異をさせていないが、本質的に同じ成長条件下で成長させた対応宿主株における通常の発現レベル以上の発現をいう。

【００４９】

いくつかの好ましい実施態様において、“増大”は望ましい特性の増加を生じる任意の修飾により達成される。例えば、いくつかの特に好ましい実施態様において、本発明はタンパク質生成を増大させる手段を提供し、増大株が親株（例えば、野生型及び／または始発株）よりも目的タンパク質を多く生成し及び／または優れた質を生じるようにする。

【００５０】

ここで用いる“発現”とは、ポリペプチドが遺伝子の核酸配列に基づいて生成されるプロセスをいう。当該プロセスは転写及び翻訳の両方を含む。

【００５１】

ここで用いる、核酸配列を細胞内に導入することに関する“導入”の語は核酸配列を細

胞内に移動させるのに適した任意の方法をいう。導入のための手段は、限定されないが、原形質融合、トランスフェクション、形質転換、接合及び形質導入などが挙げられる（例えば、Ｆｅｒｒａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．、“Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（遺伝学）”、Ｈａｒｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．（編集）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｒｐ．，第５７～７２頁、［１９８９］を参照）。

【００５２】

ここで用いる“形質転換”及び“安定な形質転換”の語は、ゲノム内に統合された、または少なくとも２世代の間維持されたエピソームプラスミドとして非天然（異種）ポリヌクレオチド配列を有する細胞をいう。

【００５３】

ここで用いる“入来配列”の語はバチルス染色体内に導入されたＤＮＡ配列をいう。いくつかの好ましい実施態様において、入来配列はＤＮＡ構築体の一部である。好ましい実施態様において、入来配列は１以上の目的タンパク質をエンコードする。いくつかの実施態様において、入来配列は形質転換される細胞のゲノム中に既に存在する、または存在しない配列であってもよい（すなわち、相同または異種配列である）。いくつかの実施態様において、入来配列は１以上の目的タンパク質、遺伝子及び／または変異または修飾遺伝子をエンコードする。別の実施態様において、入来配列は機能野生型遺伝子またはオペロン、機能変異遺伝子またはオペロン、または非機能遺伝子またはオペロンをエンコードする。いくつかの実施態様において、非機能配列は遺伝子の機能を妨害するために遺伝子内に導入できる。いくつかの実施態様において、入来配列は１以上の機能野生型遺伝子をエンコードし、一方他の実施態様において、入来配列は１以上の機能変異遺伝子をエンコードし、さらに他の実施態様において、入来配列は１以上の非機能遺伝子をエンコードする。他の実施態様において、入来配列は形質転換される宿主細胞の染色体内に既に存在する配列をエンコードする。好ましい実施態様において、入来配列はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏＩＩＳＡ、ｐｈｒＣ、ｓｉｇＢ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤ及びこれらの断片からなる群より選択される遺伝子を含む。さらに別の実施態様において、入来配列は選択マーカーを含む。さらなる実施態様において、入来配列は２つの相同ボックスを含む。

【００５４】

いくつかの実施態様において、入来配列は少なくとも１の異種タンパク質をエンコードし、限定されないが、ホルモン、酵素及び成長因子が挙げられる。他の実施態様において、酵素は、限定されないが、プロテアーゼ、エステラーゼ、リパーゼ、フェノールオキシダーゼ、パーミアーゼ、アミラーゼ、プルラナーゼ、セルラーゼ、グルコースイソメラーゼ、ラッカーゼ及びタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが挙げられる。

【００５５】

ここで用いる“相同ボックス”とはバチルス染色体の配列と相同な核酸配列をいう。より具体的には、相同ボックスは、本発明に従って不活性化される遺伝子に隣接するコード領域または遺伝子の一部と約８０～１００％配列同一性、約９０～１００％配列同一性または約９５％～１００％配列同一性を有する上流または下流領域をいう。これらの配列はバチルス染色体におけるＤＮＡ構築体の統合を目的とし、及び入来配列によりバチルス染色体の一部が置換されることを目的とする。本発明を限定するものではないが、相同ボックスは約１塩基対（ｂｐ）～２００キロ塩基（ｋｂ）を含む。好ましくは、相同ボックスは約１ｂｐ～１０．０ｋｂ；１ｂｐ～５．０ｋｂ；１ｂｐ～２．５ｋｂ；１ｂｐ～１．０ｋｂ及び０．２５ｋｂ～２．５ｋｂを含む。また、相同ボックスは約１０．０ｋｂ、５．０ｋｂ、２．５ｋｂ、２．０ｋｂ、１．５ｋｂ、１．０ｋｂ、０．５ｋｂ、０．２５ｋｂ及び０．１ｋｂを含む。いくつかの実施態様において、選択マーカーの５’及び３’末端は相同ボックスに隣接し、ここで相同ボックスは当該遺伝子のコード領域にすぐ隣接した核酸配列を含む。

【００５６】
ここで用いる“選択マーカーーエンコードヌクレオチド配列”の語は宿主細胞において発現できるヌクレオチド配列をいい、選択マーカーの発現により対応する選択因子の存在下、または必須栄養素の不存在下で発現遺伝子を含む細胞は成長できるようになる。
【００５７】
ここで用いる“選択可能マーカー”及び“選択マーカー”の語は宿主細胞中で発現できる核酸（例えば遺伝子）をいい、ベクターを含むこれら宿主の選択が簡単にできるようにする。当該選択マーカーの例としては、限定されないが、抗微生物などがある。従って、“選択マーカー”とは、宿主細胞が目的の入来ＤＮＡを取り込んだ、またはその他の反応が起こった印を与える遺伝子をいう。通常、選択マーカーは、形質転換時に外来配列を受け取らなかった細胞と外来ＤＮＡを含む細胞との区別を可能にするために宿主細胞に抗菌耐性または代謝利点を与える遺伝子をいう。“存在（ｒｅｓｉｄｉｎｇ）選択マーカー”とは、形質転換される微生物の染色体上に位置するマーカーである。存在選択マーカーは遺伝子を形質転換ＤＮＡ構築体上の選択マーカーとは異なる遺伝子をエンコードする。選択マーカーは当業者に公知である。上述の通り、好ましくは当該マーカーは抗微生物耐性マーカーである（例えば、ａｍｐ^{R}；ｐｈｌｅｏ^{R}；ｓｐｅｃ^{R}；ｋａｎ^{R}；ｅｒｙ^{R}；ｔｅｔ^{R}；ｃｍｐ^{R}；及びｎｅｏ^{R}；例えばＧｕｅｒｏｔ－Ｆｌｅｕｒｙ，Ｇｅｎｅ，１６７：３３５－３３７［１９９５］；Ｐａｌｍｅｒｏｓ ｅｔ ａｌ．、Ｇｅｎｅ ２４７：２５５－２６４［２０００］；及びＴｒｉｅｕ－Ｃｕｏｔ ｅｔ ａｌ．、Ｇｅｎｅ、２３：３３１－３４１［１９８３］を参照）。いくつかの特に好ましい実施態様において、本発明はクロラムフェニコール耐性遺伝子を提供する（例えば、ｐＣ１９４上に存在する遺伝子、及びバチルス・リケニフォルミスゲノム中に存在する耐性遺伝子）。この耐性遺伝子は本発明及び染色体上統合されたカセット及び統合プラスミドの染色体増幅に関する実施態様において特に有用である（例えば、Ａｌｂｅｒｔｉｎｉ ａｎｄ Ｇａｌｉｚｚｉ、Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１６２：１２０３－１２１１［１９８５］；及びＳｔａｈｌ ａｎｄ Ｆｅｒｒａｒｉ，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５８：４１１－４１８［１９８４］を参照）。この天然クロラムフェニコール耐性遺伝子のＤＮＡ配列を以下に示す：
【式１】
【００５８】

ATGAATTTTCAAACAATCGAGCTTGACACATGGTATAGAAAATCTTATTTTGACCATTA
CATGAAGGAAGCGAAATGTTCTTTCAGCATCACGGCAAACGTCAATGTGACAAATTTG
CTCGCCGTGCTCAAGAAAAAGAAGCTCAAGCTGTATCCGGCTTTTATTTATATCGTAT
CAAGGGTCATTCATTCGCGCCCTGAGTTTAGAACAACGTTTGATGACAAAGGAAGCT
GGGTTATTGGGAACAAATGCATCCGTGCTATGCGATTTTTCATCAGGACGACCAAAC
GTTTTCCGCCCTCTGGACGGAATACTCAGACGATTTTTCGCAGTTTTATCATCAATAT
CTTCTGGACGCCGAGCGCTTTGGAGACAAAAGGGGCCTTTGGGCTAAGCCGGACAT
CCCGCCCAATACGTTTTCAGTTTCTTCTATTCCATGGGTGCGCTTTTCAACATTCAATT
TAAACCTTGATAACAGCGAACACTTGCTGCCGATTATTACAAACGGGAAATACTTTTC
AGAAGGCAGGGAAACATTTTTGCCCGTTTCCTGCAAGTTCACCATGCAGTGTGTGAC
GGCTATCATGCCGGCGCTTTTATAA（配列番号58）

このクロラムフェニコール耐性タンパク質の推定アミノ酸配列は以下の通り：
【式２】
【００５９】

MNFQTIELDTWYRKSYFDHYMKEAKCSFSITANVNVTNLLAVLKKKKLKLYPAFIYIVSRVI
HSRPEFRTTFDDKGQLGYWEQMHPCYAIFHQDDQTFSALWTEYSDDFSQFYHQYLLDA
ERFGDKRGLWAKPDIPPNTFSVSSIPWVRFSTFNLNLDNSEHLLPIITNGKYFSEGRETFL
PVSCKFTMQCVTAIMPALL（配列番号59）

本発明に従う有用なその他のマーカーは、限定されないが、トリプトファンなどの栄養素要求性マーカー及びβ－グラクトシダーゼなどの検出マーカーである。

【００６０】

ここで用いる“プロモーター”の語は下流遺伝子の転写に直接機能する核酸配列をいう。好ましい実施態様において、プロモーターは標的遺伝子が発現するように宿主細胞に適したものである。プロモーターはその他の転写及び翻訳調節核酸配列（“制御配列”とも称される）と一緒に、所定の遺伝子を発現するために必要なものである。通常、転写及び翻訳調節配列は、限定されないが、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始及び停止配列、翻訳開始及び停止配列、及びエンハンサーまたは活性化配列などが挙げられる。

【００６１】

核酸は他の核酸配列と機能的に関連するように位置する場合、“作動可能に連結する”。例えば、分泌リーダー（すなわち、１のペプチド）をエンコードするＤＮＡはポリペプチドの分泌に参加するプレタンパク質として発現する場合、当該ポリペプチドに関するＤＮＡに作動可能に連結し；プロモーターまたはエンハンサーは配列転写に影響を与える場合、コード配列に作動可能に連結し；またはリボソーム結合部位は翻訳を促進するように位置する場合、コード配列に作動可能に連結する。一般的に“作動可能に連結する”とは、連結するＤＮＡ配列が連続していることを意味し、分泌リーダーの場合、連続かつ読取り層にある。しかしながら、エンハンサーは必ずしも連続している必要はない。結合は都合のよい制限酵素認識部位で連結することにより達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを従来実務に従って用いる。

【００６２】

“不活性化”の語は、ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤ染色体遺伝子のうち１以上の機能発現を妨げる方法を含み、当該遺伝子または遺伝子産物はその公知機能を発揮するための使用に適している。不活性化または増大化は任意の適した手段によって生じ、核酸遺伝子配列における欠失、置換（例えば変異）、阻害、及び／または挿入などがある。１の実施態様において、不活性化遺伝子の発現産物は対応するタンパク質の生物活性変化を有する短いタンパク質である。いくつかの実施態様において、生物活性変化は活性の増加であり、一方、好ましい実施態様において、当該変化は生物活性の損失を生じる。いくつかの実施態様において、変異バチルス株は好ましくは安定かつ不可逆的な不活性化を生じる１以上の遺伝子の不活性化を含む。

【００６３】

いくつかの好ましい実施態様において、不活性化は欠失により達成される。いくつかの好ましい実施態様において、遺伝子は相同組換えにより欠失する。例えば、いくつかの実施態様において、欠失する遺伝子がｓｂｏの場合、相同ボックスの両側に隣接する選択マーカーを有する入来配列を含むＤＮＡ構築体を用いる。相同ボックスは染色体ｓｂｏ遺伝子の核酸フランキング領域に相同なヌクレオチド配列を含む。ＤＮＡ構築体はバチルス宿主染色体の相同配列と一致し、二重交差（ｄｏｕｂｌｅ　ｃｒｏｓｓｏｖｅｒ）の場合、ｓｂｏ遺伝子は宿主染色体から切除される。

【００６４】

ここで用いる遺伝子の“欠失”の語は、コード配列全体の欠失、コード配列の一部の欠失、またはフランキング領域を含むコード配列の欠失をいう。欠失は染色体に残った配列が望ましい遺伝子の生物活性を与えるのであれば部分的であってもよい。コード配列のフランキング領域は約１ｂｐ～約５００ｂｐを５’及び３’末端に含むことができる。フランキング領域は５００ｂｐよりも大きくてもよいが、好ましくは本発明に従って不活性化または欠失され得るその他の遺伝子を当該領域に含まない。最終的には、欠失遺伝子は事実上、非機能的である。簡単に言えば、“欠失”の語は１以上のヌクレオチドまたはアミ

ノ酸残基がそれぞれ除去された（すなわち、存在しない）、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の変化として定義される。従って、“欠失変異体”はそれぞれの野生型生物よりも少ないヌクレオチドまたはアミノ酸を有する。

【００６５】

本発明の他の実施態様において、ＤＮＡアレイ分析（例えば、ここに記載するトランスクリプトーム分析）により測定して不適当な時に活性な遺伝子の欠失は生成タンパク質の発現の増加をもたらす。いくつかの好ましい実施態様において、ｐｃｋＡ，ｇａｐＢ、ｆｂｐ及び／またはａｌｓＤからなる群より選択される１以上の遺伝子の欠失は供給物の効率が向上した改善株を提供する。ここで用いる“トランスクリプトーム分析”とは、遺伝子転写分析をいう。

【００６６】

本発明の他の実施態様において、遺伝子は調節配列の欠失により“最適化”されると考えられ、この欠失により所望の生成物の発現が増加する。本発明のいくつかの好ましい実施態様において、トリプトファンオペロン（すなわち、遺伝子ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦを含む）はＴＲＡＰ結合ＲＮＡ配列をコードするＤＮＡ配列の欠失により最適化される（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２７０：６９６－７１０［１９９７］を参照）。この欠失は宿主細胞由来の所望の生成物の発現を増加させると考えられる。

【００６７】

他の好ましい実施態様において、不活性化は挿入による。例えば、いくつかの実施態様において、ｓｂｏが不活性化される遺伝子である場合、ＤＮＡ構築体は選択マーカーにより阻害されるｓｂｏ遺伝子を有する入来配列を含む。選択マーカーはｓｂｏコード配列部分の両側に隣接する。ＤＮＡ構築体は宿主染色体中のｓｂｏ遺伝子の本質的に同一配列と一致し、二重交差の場合、ｓｂｏ遺伝子は選択マーカーの挿入により不活性化される。簡単に言えば、“挿入”または“付加”は、それぞれ天然配列と比較して１以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の付加を生じたヌクレオチドまたはアミノ酸配列の変化である。

【００６８】

他の実施態様において、一重交差の場合、ベクターとしてプラスミドを用いた挿入により活性化される。例えば、ｓｂｏ染色体遺伝子は遺伝子または遺伝子コード配列の一部及び選択マーカーを含むプラスミドに合わせる。いくつかの実施態様において、選択マーカーは遺伝子コード配列内に位置し、または遺伝子から分離されたプラスミドの一部に位置する。ベクターはバチルス染色体内に統合され、当該遺伝子はコード配列中のベクター挿入により不活性化される。

【００６９】

別の実施態様において、不活性化は遺伝子の変異により生じる。遺伝子を変異する方法は当業者に公知であり、限定されないが、部位特異的変異、ランダム変異発生、及びｇａｐｐｅｄ－ｄｕｐｌｅｘ法が挙げられる（例えば米国特許第４，７６０，０２５号；Ｍｏｒｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｂｉｏｔｅｃｈ．２：６４６［１９８４］；及びＫｒａｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１２：９４４１［１９８４］を参照）。

【００７０】

ここで用いる“置換”とは１以上のヌクレオチドまたはアミノ酸と、それぞれ異なるヌクレオチドまたはアミノ酸との置き換えにより生じる。

【００７１】

ここで用いる“相同遺伝子”とは、異なるが、通常は関連種由来の遺伝子対をいい、それぞれが対応し、それぞれ同一または非常に類似しているものをいう。当該用語は種形成（すなわち、新しい種の発達）により分離した遺伝子（例えばオーソロガス遺伝子）、及び遺伝子重複により分離された遺伝子（例えばパラロガス遺伝子）を包含する。

【００７２】

ここで用いる“オーソログ”及び“オーソロガス遺伝子”とは種形成により共通祖先の

遺伝子（すなわち相同遺伝子）から進化した異なる種の遺伝子をいう。通常、オーソロガスは進化の過程において同じ機能を保持する。オーソロガスの同定により新しく配列決定されたゲノムの遺伝子機能の信頼性の高い推測ができる。

【００７３】

ここで用いる“パラログ”及び“パラロガス遺伝子”とはゲノム内で重複していることにより関連した遺伝子をいう。オーソログは進化の過程を通して同じ機能を維持するが、パラログはいくつかの機能は最初の機能に関連することが多いとしても、新しい機能を進化させる。パラログ遺伝子の例としては、限定されないが、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ及びトロンビンをエンコードする遺伝子が挙げられ、これらは全てセリンプロテイナーゼであり、同じ種内で一緒に生じる。

【００７４】

ここで用いる“相同性”とは、好ましい同一性を有する配列類似性または同一性をいう。この相同性は当業者に公知の標準技術を用いて決定する（例えば、Ｓｍｉｔｈ　ａｎｄ　Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．、２：４８２［１９８１］；Ｎｅｅｄｌｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈを、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４８：４４３［１９７０］；Ｐｅａｒｓｏｎ　ａｎｄ　Ｌｉｐｍａｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：２４４４［１９８８］；ウィスコンシン・ジェネティックス・ソフトウェアパッケージ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ，マディソン、ウィスコンシン州）のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ及びＴＦＡＳＴＡなどのプログラム；Ｄｅｖｅｒｅｕｘ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．，１２：３８７－３９５［１９８４］を参照）。

【００７５】

ここで用いる“類似配列”は遺伝子機能が本質的にバチルス・ズブチリス株１６８から示される遺伝子と同じであるものをいう。さらに、類似遺伝子はバチルス・ズブチリス株１６８遺伝子の配列と少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を含む。もしくは、類似配列はＢ．ズブチリス内で見られる７０～１００％の遺伝子配列を有し、及び／またはＢ．ズブチリス１６８染色体内の遺伝子と一致する領域に見られる少なくとも５～１０の遺伝子を有する。類似配列は配列決定の公知方法により決定できる。一般的に用いられる配列決定方法はＢＬＡＳＴであるが、上述及び下記に示す通りその他の方法も配列を決定するために用いることができる。

【００７６】

有用なアルゴリズムの１の例はＰＩＬＥＵＰである。ＰＩＬＥＵＰは連続（ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｖｅ）、対合配列を用いて関連配列グループから複数の配列決定を行うことができる。また、配列決定に用いる集積性関係を示す系図をプロットすることもできる。ＰＩＬＥＵＰはＦｅｎｇ及びＤｏｏｌｉｔｔｌｅの連続配列法の単純化を用いる（Ｆｅｎｇ　ａｎｄ　Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ．、３５：３５１－３６０［１９８７］）。当該方法はＨｉｇｇｉｎｓとＳｈａｒｐが説明したものと類似する（Ｈｉｇｇｉｎｓ　ａｎｄ　Ｓｈａｒｐ、ＣＡＢＩＯＳ　５：１５１－１５３［１９８９］）。有用なＰＩＬＥＵＰパラメーターは初期設定ギャップウエイトが３．００、初期設定ギャップ長さウエイトが０．１０であり、及びエンドギャップを用いる。

【００７７】

有用なアルゴリズムの他の例としてはＢＬＡＳＴアルゴリズムであり、Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．により説明されている（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５：４０３－４１０、［１９９０］；及びＫａｒｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：５８７３－５７８７［１９９３］）。特に有用なＢＬＡＳＴプログラムはＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２プログラムである（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，２６６：４６０－４８０［１９９６］を参照）。ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２はいくつかのサーチパラメーターを用い、ほとんどは初期値に設定されている。調節可能なパラメーターは以下の値に設定する：

オーバーラップスパン＝１、オーバーラップフラクション＝０．１２５、言語閾値（Ｔ）＝１１。ＨＳＰ　Ｓ及びＨＳＰ　Ｓ２パラメーターは動的値であり、特定配列の組成物及び目的配列がサーチされる特定データベースの組成物に応じてプログラム自体により設定される。しかしながら、当該値は感度を増加させるため調節できる。Ａ％のアミノ酸配列同一性値は適合同一残基の数を配列領域の“より長い”配列残基の合計数で割ることにより決定する。“より長い”配列は配列領域において実際に存在している残基を最も有する配列である（配列スコアを最大化するためにＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２により導入されたギャップは無視する）。

【００７８】

従って、“核酸配列同一性比率（％）”は、図の核酸において示されるヌクレオチド配列残基と同一である、候補配列におけるヌクレオチド残基の比率として定義される。好ましい方法はオーバーラップスパン及びオーバーラップファンクションがそれぞれ１及び０．１２５に設定された初期設定パラメーター設定のＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２のＢＬＡＳＴＮモジュールを利用する。

【００７９】

配列は配列決定される配列においてギャップ導入を含むことができる。さらに、図の核酸よりも多いまたは少ないヌクレオチドを含む配列については、相同性比率はヌクレオチド合計数と比較した相同ヌクレオチドの数に基づいて決定されることが理解される。従って、例えば、ここで同定する配列よりも短い配列の相同性は下記に説明するように、短い配列中のヌクレオチドの数を用いて決定される。

【００８０】

ここで用いる“ハイブリダイゼーション”の語は当業者に公知の塩基対合により、核酸鎖を相補鎖と接合させるプロセスをいう。

【００８１】

核酸配列は、２つの配列が中～高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件下でお互いに特異的にハイブリダイズする場合、対照核酸配列に“選択的にハイブリダイズ可能”であると考えられる。ハイブリダイゼーション条件は核酸結合複合体またはプローブの融点（Ｔｍ）に基づく。例えば、“最大ストリンジェンシー”は通常約Ｔｍ－５℃（プローブのＴｍより５°低い）で起こり、“高ストリンジェンシー”はＴｍより約５～１０℃低く；“中間ストリンジェンシー”はプローブのＴｍより約１０～２０℃低く；及び“低ストリンジェンシー”はＴｍより約２０～２５℃低い。機能上、最大ストリンジェンシー条件はハイブリダイゼーションプローブと厳密な同一性またはほぼ厳密な同一性を有する配列を同定するために用いることができ、一方、中間または低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションはポリヌクレオチド配列相同体を同定または検出するために用いることができる。

【００８２】

中～高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は当業者に公知である。高ストリンジェンシー条件の例としては、５０％ホルムアミド、５Ｘ　ＳＳＣ、５Ｘ　Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ溶液、０．５％ＳＤＳ及び１００μｇ／ｍｌ変性キャリアＤＮＡ中、約４２℃でのハイブリダイゼーションを含み、続いて２Ｘ　ＳＳＣ及び０．５％ＳＤＳ中、室温で２回洗浄し、０．１Ｘ　ＳＳＣ及び０．５％ＳＤＳ中、４２℃でさらに２回洗浄する。中ストリンジェント条件の例としては、２０％ホルムアミド、５Ｘ　ＳＳＣ（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１５ｍＭ　クエン酸３ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５Ｘ　Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ溶液、１０％　硫酸デキストラン及び２０ｍｇ／ｍｌ変性せん断サケ精子ＤＮＡを含む溶液中、３７℃で一晩中培養し、続いて１Ｘ　ＳＳＣ中、約３７～５０℃でフィルターを洗浄する。プローブ長さ等の因子を適合させるために必要な温度、イオン強度等の調節の仕方は、当業者に公知である。

【００８３】

ここで用いる“組換え体”は、異種核酸配列の導入により修飾された、または細胞がそのように修飾された細胞に由来する、細胞またはベクターに関するものを含む。従って、

例えば組換え細胞は、意図的なヒトの介入の結果として発現または発現されない条件下で、当該細胞の天然型（非組換え体）内で同一の形態で見られない遺伝子を発現し、または異常発現される天然遺伝子を発現する。“組換え”または“組換え”核酸の生成は通常、２以上の核酸断片の組み立てであり、当該組み立てによりキメラ遺伝子が生じる。

【００８４】

好ましい実施態様において、変異ＤＮＡ断片は少なくとも１のコドンにおいて部位飽和性（ｓｉｔｅ　ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ）突然変異誘発を用いて生じる。他の好ましい実施態様において、部位飽和性突然変異誘発は２以上のコドンについて行われる。さらなる実施態様において、変異ＤＮＡ配列は野生型配列と４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上または９８％以上の相同性を有する。別の実施態様において、変異ＤＮＡは公知の変異誘発手順、例えば、放射、ニトロソグアニジン等を用いてｉｎ　ｖｉｖｏで生じる。それから望ましいＤＮＡ配列は単離し、ここに提供する方法において用いられる。

【００８５】

別の実施態様において、形質転換ＤＮＡ配列は入来配列が存在しない相同ボックスを含む。この実施態様において、２つの相同ボックス間の内生ＤＮＡ配列を欠失することが望ましい。さらに、いくつかの実施態様において、形質転換する配列は野生型であり、一方他の実施態様において、それらは変異または修飾配列である。さらに、いくつかの実施態様において、形質転換する配列は相同であり、一方他の実施態様において、それらは異種のものである。

【００８６】

ここで用いる“標的配列”の語は、入来配列が宿主細胞ゲノム内に挿入されることが望ましい配列をエンコードする宿主細胞中のＤＮＡ配列をいう。いくつかの実施態様において、標的配列は機能野生型遺伝子またはオペロンをエンコードし、一方、他の実施態様において、標的配列は機能変異遺伝子またはオペロンまたは非機能遺伝子またはオペロンをエンコードする。

【００８７】

ここで用いる“フランキング配列”とは対象の配列の上流または下流にある配列をいう（例えば、遺伝子Ａ－Ｂ－Ｃは、遺伝子ＢはＡ及びＣ遺伝子配列にフランキング（側面に位置）している）。好ましい実施態様において、入来配列は相同ボックスの両側の側面に位置する。他の実施態様において、入来配列及び相同ボックスはｓｔｕｆｆｅｒ配列の両側の側面に位置する単位を含む。いくつかの実施態様において、フランキング配列は一方の側（３’または５’）にのみ存在するが、好ましい実施態様において、配列の両側の側面に位置する。各相同ボックスの配列はバチルス染色体中の配列に相同である。これらの配列はバチルス染色体に新しい構築体が統合されること、及びバチルス染色体の一部が入来配列により置換されることを目的とする。好ましい実施態様において、選択マーカーの５’及び３’末端は不活性化染色体断片の一部を含むポリヌクレオチド配列の側面に位置する。いくつかの実施態様において、フランキング配列は一方の側（３’または５’）にのみ存在するが、好ましい実施態様において、配列の両側の側面に位置する。

【００８８】

ここで用いる“ｓｔｕｆｆｅｒ配列”の語は相同ボックスの側面に位置する任意の余分なＤＮＡをいう（通常ベクター配列）。しかしながら、当該用語は非相同ＤＮＡ配列を包含する。いかなる理論にも限定するものではないが、ｓｔｕｆｆｅｒ配列はＤＮＡ取込みを開始するために細胞に重要でない標的を提供する。

【００８９】

ここで用いる、“変異体ライブラリー”の語は、そのゲノムのほとんどは同一だが、１以上の遺伝子が異なる相同体を含む細胞集団をいう。当該ライブラリーは例えば、改善形質を有する遺伝子またはオペロンを同定するための方法において使用できる。

【００９０】

ここで用いる“ハイパーコンピテント”及び“スーパーコンピテント”とは、細胞集団の１％以上が染色体ＤＮＡ（例えば、バチルスＤＮＡ）と形質転換可能であることを意味する。もしくは、当該用語は細胞集団の１０％以上が自己複製プラスミド（例えば、バチルスプラスミド）と形質転換可能である細胞集団に関して用いられる。好ましくは、スーパーコンピテント細胞は野生型または親細胞集団について観測されるよりも大きな割合で形質転換される。スーパーコンピテント及びハイパーコンピテントはここでは交換可能に用いられる。

【００９１】

ここで用いる、“増幅”及び“遺伝子増幅”の語は特定ＤＮＡが増幅遺伝子が初期ゲノムに存在した数より多いコピー数で存在するように偏って複製されるプロセスをいう。いくつかの実施態様において、薬物存在下（例えば、阻害可能酵素のインヒビター）での増殖による細胞選択は、薬物存在下での増殖に必要な遺伝子産物をエンコードする内生遺伝子の増幅、またはこの遺伝子産物をエンコードする外来（すなわち、入来）配列の増幅または両方をもたらす。

【００９２】

“増幅”はテンプレート特異性に関する核酸複製の特殊なケースである。これは非特異性テンプレート複製（すなわち、テンプレート依存性であるが特定テンプレートに依存しない複製）と対比される。テンプレート特異性は複製の忠実度（すなわち、適正なポリヌクレオチド配列の合成）及びヌクレオチド（リボーまたはデオキシリボー）特異性とはここでは区別される。テンプレート特異性は“標的”特異性に関して説明されることが多い。標的配列は、それらがその他の核酸から選別するために探されるという意味において“標的”である。増幅技術はこの選別を第一に考えて設計されてきた。

【００９３】

ここで用いる“共増幅”の語は、その他の遺伝子配列が一緒に導入される増幅マーカーの１の細胞内への導入（すなわち、発現ベクター内に含まれる遺伝子のような１以上の非選択遺伝子を含む）及び細胞が増幅マーカーとその他の非選択遺伝子配列の両方を増幅するような適当な選択圧の増幅をいう。増幅マーカーはその他の遺伝子配列に物理的に結合していてもよく、またはＤＮＡが２つの別個の断片、すなわち一方が増幅マーカーを含み、及びもう一方が非選択マーカーを含むものが同じ細胞内に導入されてもよい。

【００９４】

ここで用いる、“増幅マーカー”、“増幅遺伝子”及び“増幅ベクター”の語は適当な増殖条件下で遺伝子の増幅を可能にする遺伝子をエンコードする遺伝子またはベクターをいう。

【００９５】

“テンプレート特異性”はほとんどの増幅技術において酵素選択により達成される。増幅酵素は使用される条件下において、核酸の外来混合物において核酸の特定配列のみ処理する酵素である。例えば、Ｑβレプリカーゼの場合、ＭＤＶ－１　ＲＮＡはレプリカーゼの特異テンプレートである（例えば、Ｋａｃｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　６９：３０３８［１９７２］を参照）。その他の核酸はこの増幅酵素によっては複製されない。同様に、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼの場合、この増幅酵素はそれ自身のプロモーターにストリンジェントな特異性を有する（Ｃｈａｍｂｅｒｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ　２２８：２２７［１９７０］を参照）。Ｔ４　ＤＮＡリガーゼの場合、当該酵素は２つのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを連結せず、ここで連結接合部分にオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基質とテンプレート間の不整合が存在する（Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗａｌｌａｃｅ，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　４：５６０［１９８９］を参照）。最後に、Ｔａｑ及びＰｆｕポリメラーゼは、高温で機能する能力を有するため、配列結合の高い特異性を示し、従って、プライマーにより確定され；高温が標的配列とのプライマーハイブリダイゼーションに有利に働き、非標的配列とのハイブリダイゼーションには有利でない熱力学的条件を生じる。

【００９６】

ここで用いる“増幅核酸”の語は任意の増幅方法により増幅され得る核酸をいう。“増幅核酸”は通常“サンプルテンプレート”を含むことが考えられる。

【００９７】

ここで用いる“サンプルテンプレート”の語は、“標的”（下記に定義）の存在に関して分析されるサンプルから生じる核酸をいう。一方、“背景テンプレート”はサンプルテンプレート以外の核酸に関して用いられ、サンプル内に存在していてもいなくてもよい。背景テンプレートはほとんどの場合、故意のものではない。それは以前のものからの影響の結果であり、またはサンプルから精製すべき核酸汚染物質の存在によるものである。例えば、検出すべき微生物以外の生物由来の核酸は試験サンプル内で背景として存在し得る。

【００９８】

ここで用いる、“プライマー”の語は、精製制限消化などにおいて自然に生じるまたは合成的に生成されるオリゴヌクレオチドをいい、核酸鎖に相補的なプライマー伸長生成物の合成が導入される条件下に置かれた場合（すなわち、ヌクレオチド及びＤＮＡポリメラーゼなどの誘発剤の存在下、及び適した温度及びｐＨで）、合成開始点として作用できる。当該プライマーは好ましくは増幅効率を最大にする１本鎖であるが、あるいは２本鎖であってもよい。２本鎖の場合、プライマーは伸長生成物の準備のために用いる前にそのストランドを分離処理する。好ましくは、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは誘発剤の存在下、伸長生成物の合成開始のため十分に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、誘発温度、プライマーの供給源及び使用する方法など多くの因子に左右される。

【００９９】

ここで用いる“プローブ”の語は、精製制限消化などにおいて自然に生じる、または合成、組換えまたはＰＣＲ増幅により生成されるオリゴヌクレオチド（すなわちヌクレオチド配列）をいい、別の目的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズできる。プローブは１本鎖または２本鎖である。プローブは特定遺伝子配列の検出、同定及び単離に有用である。本発明で使用されるいかなるプローブも任意の“リポーター分子”で標識するので、任意の検出システムにおいて検出可能であり、限定されないが、酵素（例えば、ＥＬＩＳＡ及び酵素ベースの組織化学的分析）、蛍光、放射性及び発光性システムなどがある。本発明はいかなる特定の検出システムまたは標識にも限定されない。

【０１００】

ここで用いる“標的”の語はポリメラーゼ連鎖反応に関して用いる場合、ポリメラーゼ連鎖反応に用いるプライマーが結合する核酸領域をいう。従って、“標的”はその他の核酸配列から選別するために探求されるものである。“断片”は標的配列内の核酸領域として定義される。

【０１０１】

ここで用いる“ポリメラーゼ連鎖反応”（“ＰＣＲ”）の語はここに引用する米国特許第４，６８３，１９５号、第４，６８３，２０２号及び第４，９６５，１８８号の方法をいい、クローニングまたは精製することなくゲノムＤＮＡの混合物における標的配列の断片濃度を増加させる方法を含む。標的配列を増幅するこの方法は、所望の標的配列を含むＤＮＡ混合物に過剰な２つのオリゴヌクレオチドプライマーを導入し、ＤＮＡポリメラーゼの存在下、サーモサイクルの正確な配列を行うことからなる。２つのプライマーは２本鎖標的配列のそれぞれの鎖に相補的である。増幅をもたらすために、混合物を変性させ、それからプライマーを標的分子内のそれらの相補配列にアニールする。アニーリングに続いて、プライマーは新しい相補鎖ペアを形成するためにポリメラーゼを用いて伸長する。変性、プライマーアニーリング及びポリメラーゼ伸長工程は何回も繰り返すことができ（すなわち変性、アニーリング、及び伸長は１“サイクル”を構成し、多数の“サイクル”を行うことができる）、所望の標的配列の増幅断片を高濃度で得ることができる。所望の標的配列の増幅断片の長さはお互いのプライマーの相対位置により決定され、従って、この長さは制御可能なパラメーターである。当該プロセスの繰返し側面のため、当該方法は

“ポリメラーゼ連鎖反応”（以下“ＰＣＲ”とする）と呼ばれる。標的配列の所望の増幅断片は混合物中で主要な配列（濃度に関して）となるので、それらは“ＰＣＲ増幅された”という。

【０１０２】

ここで用いる“増幅試薬”の語は、プライマー、核酸テンプレート及び増幅酵素以外の増幅に必要な試薬をいう（デオキシリボヌクレオチド３リン酸、バッファー等）。通常、増幅試薬はその他の反応成分と一緒に反応容器（試験管、マイクロウェル等）内に加えて含まれる。

【０１０３】

ＰＣＲを用いて、ゲノムＤＮＡ中の特異標的配列の１のコピーをいくつかの異なる方法で検出可能なレベルまで増幅することが可能である（例えば、標識プローブを用いるハイブリダイゼーション；ビオチン化プライマーの混合、続いてアビジン－酵素結合検出；ｄＣＴＰまたはｄＡＴＰなどの^{32}Ｐ標識デオキシヌクレオチド３リン酸の増幅断片への混合）。ゲノムＤＮＡに加えて、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列が適当なプライマー分子のセットを用いて増幅できる。特に、ＰＣＲプロセスにより作成された増幅断片はそれ自身、続くＰＣＲ増幅の効率的なテンプレートである。

【０１０４】

ここで用いる“ＰＣＲ生成物”“ＰＣＲ断片”及び“増幅生成物”の語は変性、アニーリング及び伸長が完結する２以上のサイクルのＰＣＲ工程後の化合物の最終混合物をいう。これらの語は１以上の標的配列の１以上の断片の増幅が行われる場合を含む。

【０１０５】

ここで用いる“ＲＴ－ＰＣＲ”の語はＲＮＡ配列の複製及び増幅をいう。この方法では、ここに引用する米国特許第５，３２２，７７０号に記載されているように、ほとんどの場合熱安定性ポリメラーゼを用いる１の酵素手順を用いて、逆転写とＰＣＲを組み合わせる。ＲＴ－ＰＣＲにおいて、ＲＮＡテンプレートはポリメラーゼの逆転写酵素活性によりｃＤＮＡに転換され、それからポリメラーゼの重合活性を用いて増幅させる（すなわち、他のＰＣＲ法と同様）。

【０１０６】

ここで用いる“制限エンドヌクレアーゼ”及び“制限酵素”の語は細菌性酵素をいい、それぞれ特定ヌクレオチド配列で、またはその近くで２本鎖ＤＮＡを切断する。

【０１０７】

“制限酵素認識部位”とは所定の制限エンドヌクレアーゼにより認識及び切断されるヌクレオチド配列をいい、ＤＮＡ断片の挿入部位であることが多い。本発明の特定の実施態様において、制限酵素認識部位は選択マーカー内及びＤＮＡ構築体の５’及び３’末端内に設計される。

【０１０８】

ここで用いる“不活性化染色体断片”とは２つの部分を含む。各部分は、ここに定義するように固有の染色体領域にすぐ隣接するゲノム染色体ＤＮＡの上流または下流に相同なポリヌクレオチドを含む。“すぐ隣接する”とは、不活性化染色体断片を含むヌクレオチドが固有染色体領域を画定するヌクレオチドを含まないことを意味する。不活性化染色体断片はバチルス染色体中にＤＮＡ構築体を統合し、バチルス染色体の一部を置換することを目的とする。

【０１０９】

ここで用いる“固有染色体領域”及び“固有染色体領域の断片”とは本発明のいくつかの実施態様においてバチルス宿主細胞から欠失されるバチルス染色体の断片をいう。通常、“断片”、“領域”、“部分”及び“要素”の語はここでは交換可能に用いられる。いくつかの実施態様において、欠失断片は公知の機能を有する１以上の遺伝子を含み、一方他の実施態様において、欠失断片は未知の機能を有する１以上の遺伝子を含み、及び他の実施態様において、欠失断片は公知及び未知の機能を含む遺伝子の組み合わせを含む。いくつかの実施態様において、固有染色体領域またはそれらの断片は２００程度またはそれ

以上の遺伝子を含む。
【０１１０】
いくつかの実施態様において、固有染色体領域またはそれらの断片は特定の条件下で必要な機能を有するが、当該領域は研究室条件下では必ずしもバチルス株生存に必須のものではない。好ましい研究室条件は、限定されないが、標準温度及び大気条件（例えば好気性）での発酵槽、振とうフラスコ中、プレート培地上等での成長などの条件がある。
【０１１１】
固有染色体領域またはそれらの断片は約０．５ｋｂ～５００ｋｂ、約１．０ｋｂ～５００ｋｂ、約５ｋｂ～５００ｋｂ、約１０ｋｂ～５００ｋｂ、約１０ｋｂ～２００ｋｂ、約１０ｋｂ～１００ｋｂ、約１０ｋｂ～５０ｋｂ、約１００ｋｂ～５００ｋｂ、約２００～５００ｋｂの範囲のバチルス染色体を含む。他の側面において、固有染色体領域またはそれらの断片が欠失された場合、変異バチルス株の染色体は９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８５％、８０％、７５％または７０％の対応する非変異バチルス宿主染色体を含むことができる。好ましくは、本発明に従う変異バチルス株の染色体は約９９～９０％、９９～９２％及び９８～９４％の対応する非変異バチルス宿主株染色体ゲノムを含む。
【０１１２】
ここで用いる“株生存性”とは繁殖可能性をいう。固有染色体領域またはそれらの断片の欠失は研究所条件下において変異バチルス株の分割及び生存に有害な影響を与えるものではない。
【０１１３】
ここで用いる、“変異バチルス株”とは遺伝子組換えバチルス種をいい、ここで目的タンパク質は本質的に同じ成長条件下で成長させた対応する非変異バチルス宿主株における同じ目的タンパク質の発現及び／または生成と比較して発現及び／または生成レベルが増大している。いくつかの実施態様において、発現レベルの増加は１以上の染色体遺伝子の不活性化により生じる。１の実施態様において、発現レベルの増加は１以上の染色体遺伝子の欠失により生じる。いくつかの実施態様において、変異バチルス株は１以上の固有染色体領域またはそれらの断片が欠失した遺伝子組換えバチルス種であり、ここで目的タンパク質は本質的に同じ成長条件下で成長させた対応する非変異バチルス宿主株における同じ目的タンパク質の発現及び／または生成と比較して発現または生成レベルが増大している。別の実施態様において、発現レベルの増加は１以上の染色体遺伝子の挿入不活性化により生じる。いくつかの別の実施態様において、発現レベルの増加は活性の増加または最適化遺伝子により生じる。いくつかの好ましい実施態様において、不活性化遺伝子はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｐｈｒＣ、ｓｉｇＢ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される。
【０１１４】
特定の実施態様において、変異バチルス株は不活性化遺伝子を２つ含み、一方他の実施態様において不活性化遺伝子３つ、不活性化遺伝子４つ、不活性化遺伝子５つ、不活性化遺伝子６つまたはそれ以上存在する。従って、不活性化遺伝子の数は特定の遺伝子数に限定されない。いくつかの実施態様において、不活性化遺伝子はお互いに連続であり、一方他の実施態様において、それらはバチルス染色体の離れた領域に位置する。いくつかの実施態様において、不活性化染色体遺伝子は特定の条件下において必要な機能を有するが、当該遺伝子は研究所条件下において必ずしもバチルス株生存に必須のものではない。好ましい研究室条件は、限定されないが、微生物の成長に適した発酵槽、振とうフラスコ中、プレート培地上等での成長などの条件がある。
【０１１５】
ここで用いる“対応する非変異バチルス株”とは、固有染色体領域またはそれらの断片がそこから欠失または修飾される、及び変化株が生成する宿主株（例えば、最初の及び／

または野生型株）である。
【０１１６】
ここで用いる“染色体統合”の語は入来配列が宿主細胞（例えば、バチルス）の染色体内に導入されるプロセスをいう。形質転換ＤＮＡの相同領域は染色体の相同領域と一致する。続いて、相同ボックス間の配列を二重交差の入来配列で置換する（すなわち、相同組換え）。本発明のいくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体の不活性化染色体断片の相同部分はバチルス染色体の固有染色体領域のフランキング相同領域と一致する。続いて、固有染色体領域は二重交差でＤＮＡ構築体により欠失される（すなわち相同組換え）。
【０１１７】
“相同組換え”とは、同一またはほぼ同一のヌクレオチド配列部位での２つの分子間または対の染色体間のＤＮＡ断片の交換を意味する。好ましい実施態様において、染色体統合は相同組換えである。
【０１１８】
ここで用いる“相同配列”は比較のために最適に配列した場合、他の核酸またはポリペプチド配列と１００％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８８％、８５％、８０％、７５％または７０％配列同一性を有する核酸またはポリペプチド配列を意味する。いくつかの実施態様において、相同配列は８５％～１００％の配列同一性を有し、一方他の実施態様において、９０％～１００％の配列同一性、及びより好ましい実施態様において、９５％～１００％の配列同一性を有する。
【０１１９】
ここで用いる“アミノ酸”とは、ペプチドまたはタンパク質配列またはそれらの一部をいう。“タンパク質”、“ペプチド”及び“ポリペプチド”の語は交換可能に用いられる。
【０１２０】
ここで用いる“目的タンパク質”及び“目的ポリペプチド”とは望ましい及び／または評価対象のタンパク質／ポリペプチドをいう。いくつかの実施態様において、目的タンパク質は細胞内にあり、一方他の実施態様において、それは分泌ポリペプチドである。特に好ましいポリペプチドは酵素を含み、限定されないが、でんぷん分解酵素、タンパク質分解酵素、細胞分解（ｃｅｌｌｕｌｙｔｉｃ）酵素、酸化還元酵素及び植物細胞壁分解酵素から選択される酵素である。より具体的には、これらの酵素は限定されないが、アミラーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、リパーゼ、ラッカーゼ、フェノールオキシダーゼ、オキシダーゼ、クチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、エステラーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、フィターゼ、ペクチナーゼ、グルコシダーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼ及びキチナーゼを含む。本発明のいくつかの特に好ましい実施態様において、目的ポリペプチドはプロテアーゼである。いくつかの実施態様において、目的タンパク質は１のペプチドに融合される分泌ポリペプチドである（すなわち、分泌されるタンパク質上でのアミノ末端伸長）。ほとんど全ての分泌タンパク質は、膜透過の前駆体タンパク質のターゲッティング及び翻訳において重要な役割を果たすアミノ末端タンパク質伸長を用いる。この伸長は、膜移動の間またはそのすぐ後にシグナルペプチダーゼによりタンパク質分解により除去される。
【０１２１】
本発明のいくつかの実施態様において、目的ポリペプチドはホルモン、抗体、成長因子、受容体等から選択される。ホルモンは本発明に含まれ、限定されないが、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、ソマトスタチン、ゴナドトロピンホルモン、バソプレシン、オキシトシン、エリスロポエチン、インスリン等が挙げられる。成長因子は限定されないが、血小板由来成長因子、インスリン様成長因子、上皮成長因子、神経成長因子、線維芽細胞成長因子、形質転換成長因子、サイトカイン、例えばインターロイキン（例えば、ＩＬ－１からＩＬ－１３）、インターフェロン、コロニー刺激因子等が挙げられる。抗体は限定されないが、抗体を生成するのが望ましい任意の種か

ら直接得られる免疫グロブリンが挙げられる。さらに、本発明は修飾抗体を含む。ポリクローナル及びモノクローナル抗体も本発明に含まれる。特に好ましい実施態様において、抗体はヒト抗体である。

【０１２２】

ここで用いる“異種タンパク質”の語は宿主細胞に天然に生じないタンパク質またはポリペプチドをいう。異種タンパク質の例としては、加水分解酵素、例えばプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ及びリパーゼなど；イソメラーゼ、例えばラセマーゼ、エピメラーゼ、トートメラーゼまたはムターゼなど；トランスフェラーゼ、キナーゼ及びホスファターゼなどの酵素を含む。いくつかの実施態様において、タンパク質は治療的に重要なタンパク質またはペプチドであり、限定されないが、成長因子、サイトカイン、配位子、受容体及びインヒビター並びにワクチン及び抗体を含む。別の実施態様において、タンパク質は商業的に重要な工業タンパク質／ペプチドである（例えば、プロテアーゼ、アミラーゼ及びグルコアミラーゼなどのカルボヒドラーゼ、セルラーゼ、オキシダーゼ及びリパーゼ）。いくつかの実施態様において、タンパク質をエンコードする遺伝子は天然遺伝子であり、一方他の実施態様において、変異及び／または合成遺伝子が使用される。

【０１２３】

ここで用いる“相同タンパク質”とは細胞内の野生型または天然タンパク質またはポリペプチドをいう。好ましい実施態様において、当該細胞はグラム陽性細胞であり、一方特に好ましい実施態様において、当該細胞はバチルス宿主細胞である。別の実施態様において、相同タンパク質はその他の生物、限定されないが大腸菌などにより生成された天然タンパク質である。本発明は組換えＤＮＡ技術により相同タンパク質を生成する宿主細胞を包含する。

【０１２４】

ここで用いる“オペロン領域”は、共有プロモーターからの１の転写単位として転写され、それにより共調節される隣接遺伝子のグループを含む。いくつかの実施態様において、オペロンは調節遺伝子を含む。最も好ましい実施態様において、ＲＮＡレベルで測定して高度に発現するが未知または不必要な機能を有するオペロンが用いられる。

【０１２５】

ここで用いる“複数－隣接単一遺伝子領域”とは、少なくとも２つの遺伝子のコード領域が一列になって起こる領域であり、及びいくつかの実施態様において、コード領域に先行及び後に続く介在配列を含む。いくつかの実施態様において、抗菌領域を導入する。

【０１２６】

ここで用いる“抗菌領域”は抗菌タンパク質をエンコードする少なくとも１の遺伝子を含む領域である。

【０１２７】

発明の詳細な説明

本発明は発現タンパク質を生成する能力を変化させるために遺伝子組換えした細胞を提供する。特に、本発明は、目的タンパク質の発現が増大したバチルス種などのグラム陽性細菌に関し、ここで１以上の染色体遺伝子が不活性化され、好ましくは１以上の染色体遺伝子がバチルス染色体から欠失される。いくつかの実施態様において、１以上の固有の染色体領域が対応する野生型バチルス宿主染色体から欠失される。実際、本発明は１または複数の遺伝子を欠失する方法、及び大量の染色体を欠失させる方法を提供する。好ましい実施態様において、当該欠失は目的タンパク質の生成向上などの利点を提供する。

【０１２８】

Ａ．遺伝子欠失

上述の通り、本発明は１または複数の遺伝子欠失及び／または変異及び大量の染色体欠失に関する実施態様を含む。

【０１２９】

いくつかの好ましい実施態様において、本発明は入来配列を含むＤＮＡ構築体を含む。

ＤＮＡ構築体はｉｎ　ｖｉｔｒｏで組み立てられ、それからコンピテントバチルス宿主内に当該構築体の直接クローニングを行い、ＤＮＡ構築体がバチルス染色体内に統合されるようにする。例えば、ＰＣＲ融合及び／または連結はＤＮＡ構築体をｉｎ　ｖｉｔｒｏで組み立てるために用いることができる。いくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体は非プラスミド構築体であり、一方他の実施態様において、ベクター（例えばプラスミド）内に組み込まれる。いくつかの実施態様において、環状プラスミドを使用する。好ましい実施態様において、環状プラスミドは適当な制限酵素を用いるために設計される（すなわち、ＤＮＡ構築を阻害しないもの）。従って、線状プラスミドは本発明で使用できる（図１を参照）。しかしながら、その他の方法も本発明での使用に適しており、当業者に公知である（例えば、Ｐｅｒｅｇｏ，“Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒｓ　ｆｏｒ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ　ｉｎ　Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ（バチルス・ズブチリスにおける遺伝子操作のための統合ベクター）”、（Ｓｏｎｅｎｓｈｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（編集）、<u>Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ　ａｎｄ　Ｏｔｈｅｒ　Ｇｒａｍ－Ｐｏｓｉｔｉｖｅ　Ｂａｃｔｅｒｉａ</u>（バチルス・ズブチリス及びその他のグラム陽性細菌），Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　ｆｏｒ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，ワシントン、ＤＣ［１９９３］を参照）。

【０１３０】

いくつかの実施態様において、入来配列は選択マーカーを含む。いくつかの好ましい実施態様において、入来配列は、ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｐｈｒＣ、ｓｉｇＢ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤまたはこれらの遺伝子のいずれかの断片（単独または組み合わせ）からなる群より選択される染色体遺伝子を含む。別の実施態様において、入来配列は相同ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｐｈｒＣ、ｓｉｇＢ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及び／またはｒｏｃＤ遺伝子配列を含む。相同配列はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｐｈｒＣ、ｓｉｇＢ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤ遺伝子またはそれらの遺伝子断片と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、９０％、８８％、８５％、または８０％配列同一性を有する核酸配列であり、入来配列に含まれる。好ましい実施態様において、相同配列を含む入来配列はｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｐｈｒＣ、ｓｉｇＢ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦまたはｒｏｃＤ遺伝子またはそれらの遺伝子断片と少なくとも９５％配列同一性を有する。さらに別の実施態様において、入来配列は遺伝子配列の断片を有する５’及び３’末端の側面に位置する選択マーカーを含む。いくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体が選択マーカー及び遺伝子を含む場合、遺伝子断片またはそれに相同な配列は宿主細胞内に形質転換され、選択マーカーの配置は当該遺伝子の本来の目的に関して非機能的なものにする。いくつかの実施態様において、入来配列は遺伝子のプロモーター領域に位置する選択マーカーを含む。他の実施態様において、入来配列は遺伝子のプロモーター領域の後に位置する選択マーカーを含む。さらに他の実施態様において、入来配列は遺伝子のコード領域に位置する選択マーカーを含む。さらに別の実施態様において、入来配列は両末端上の相同ボックスの側面に位置する選択マーカーを含む。さらに別の実施態様において、入来配列はコード配列の転写及び／または翻訳を妨害する配列を含む。さらに別の実施態様において、ＤＮＡ構築体は当該構築体の上流及び下流末端に設計された制限酵素認識部位を含む。

【０１３１】
　ＤＮＡ構築体はベクター内に組み込まれ、またはプラスミドＤＮＡの不存在下で使用されるかに関わらず、微生物を形質転換するために使用される。形質転換に適したいかなる方法も本発明で使用できる。好ましい実施態様において、少なくとも１のＤＮＡ構築体のコピーが宿主バチルス染色体内に統合される。いくつかの実施態様において、本発明の１以上のＤＮＡ構築体は宿主細胞を形質転換するために用いる。例えば、１のＤＮＡ構築体はｓ／ｒ遺伝子を不活性化するために用い、他の構築体はｐｈｒＣ遺伝子を不活性化するために用いることができる。もちろん、別の組み合わせも考えられ、本発明により提供される。

【０１３２】
　いくつかの好ましい実施態様において、ＤＮＡ構築体は目的タンパク質をエンコードするポリヌクレオチドも含む。これらの好ましい実施態様のいくつかにおいて、ＤＮＡ構築体は目的タンパク質をエンコードする配列に作動可能に連結する構成または導入プロモーターも含む。目的タンパク質がプロテアーゼであるいくつかの好ましい実施態様において、プロモーターはｔａｃプロモーター、β－ラクタマーゼプロモーター、またはａｐｒＥプロモーター（ＤｅＢｏｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８０：２１－２５［１９８３］）からなる群より選択される。しかしながら、本発明はいかなる特定のプロモーターにも限定されるものではなく、当業者に公知の任意の適したプロモーターが本発明で使用できる。とはいえ、特に好ましい実施態様において、プロモーターはＢ．ズブチリスａｐｒＥプロモーターである。

【０１３３】
　バチルス種の形質転換に関する様々な方法が公知である。実際に、プラスミド構築体及び当該プラスミドを大腸菌内に形質転換することを含むバチルス染色体を改変させる方法が公知である。ほとんどの方法において、プラスミドは大腸菌からその後単離され、バチルス内に形質転換される。しかしながら、大腸菌などの介在微生物を使用することは必須ではなく、いくつかの好ましい実施態様においてＤＮＡ構築体はコンピテントバチルス宿主内に直接形質転換される。

【０１３４】
　いくつかの実施態様において、公知のバチルスズブチリス株１６８は本発明で使用できる。実際にこの株のゲノムはよく特性付けられている（Ｋｕｎｓｔ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ　３９０：２４９－２５６［１９９７］；及びＨｅｎｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．，４４：５７－８２［１９８０］を参照）。ゲノムは４２１５ｋｂ染色体からなる。ここで用いる統合は１６８株に言及するが、本発明はバチルス株に類似の配列を包含する。

【０１３５】
　いくつかの実施態様において、入来染色体配列は、ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ／ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤ、それらの遺伝子断片及びそれらに相同な配列からなる群より選択される１以上の遺伝子を含む。Ｂ．ズブチリス１６８由来のこれら遺伝子のＤＮＡコード配列は配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号１７、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号３７、配列番号２５、配列番号２１、配列番号５０、配列番号２９、配列番号２３、配列番号２７、配列番号１９、配列番号３１、配列番号４８、配列番号４６、配列番号３５及び配列番号３３において提供される。

【０１３６】
　上述の通り、いくつかの実施態様において、ｓｂｏ、ｓｌｒ、ｙｂｃＯ、ｃｓｎ、ｓｐｏｌｌＳＡ、ｓｉｇＢ、ｐｈｒＣ、ｒａｐＡ、ＣｓｓＳ、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ

、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、ｔｒｐＦ、ｔｄｈ、ｋｂｌ、ａｌｓＤ、ｓｉｇＤ、ｐｒｐＣ、ｇａｐＢ、ｐｃｋＡ、ｆｂｐ、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤ遺伝子、それらの遺伝子断片またはそれらに相同な配列を含む入来配列はコード領域を含み、すぐ隣に染色体コード領域フランキング配列をさらに含むことができる。いくつかの実施態様において、コード領域フランキング配列は約１ｂｐ～２５００ｂｐ；約１ｂｐ～１５００ｂｐ、約１ｂｐ～１０００ｂｐ、約１ｂｐ～５００ｂｐ、及び１ｂｐ～２５０ｂｐの範囲を含む。コード領域フランキング配列を含む核酸配列の数は遺伝子コード配列の各末端ごとに異なる。例えば、いくつかの実施態様において、コード配列の５’末端は２５ｂｐ以下を含み、コード配列の３’末端は１００ｂｐ以上を含む。これらの遺伝子の配列及び遺伝子産物を以下に示す。ここで用いる番号はｓｕｂｔｉｌｉｓｔで用いられるものである（例えば、Ｍｏｓｚｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１４１：２６１－２６８［１９９５］を参照）。

【０１３７】

Ｂ．ズブチリス１６８のｓｂｏコード配列を以下に示す：

【式３】

【０１３８】

ATGAAAAAAGCTGTCATTGTAGAAAACAAAGGTTGTGCAACATGCTCGATCGGAGCCG
CTTGTCTAGTGGACGGTCCTATCCCTGATTTTGAAATTGCCGGTGCAACAGGTCTATTC
GGTCTATGGGGG（配列番号１）

ｓｂｏの推定アミノ酸配列は：

【式４】

【０１３９】

MKKAVIVENKGCATCSIGAACLVDGPIPDFEIAGATGLFGLWG（配列番号２）

１の実施態様において、Ｂ．ズブチリス１６８染色体の約３８３４８６８～３８３５２１９で見られる遺伝子領域は本発明を用いて欠失させた。約３８３５０８１から３８３５２０９で見られるｓｂｏコード領域はズブチリシンＡ、すなわちいくつかのグラム陽性細菌に対する活性を有する抗菌薬を生成する（Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８１：７３４６－７３５５［１９９４］を参照）。

【０１４０】

Ｂ．ズブチリス１６８のｓｌｒコード配列を以下に示す：

【式５】

【０１４１】

ATGATTGGAAGAATTATCCGTTTGTACCGTAAAAGAAAAGGCTATTCTATTAATCAGCTG
GCTGTTGAGTCAGGCGTATCCAAATCCTATTTAAGCAAGATTGAAAGAGGCGTTCACAC
GAATCCGTCCGTTCAATTTTTAAAAAAAGTTTCTGCCACACTGGAAGTTGAATTAACAGA
ATTATTTGACGCAGAAACAATGATGTATGAAAAAATCAGCGGCGGTGAAGAAGAATGGC
GCGTACATTTAGTGCAAGCCGTACAAGCCGGGATGGAAAAGGAAGAATTGTTCACTTTT
ACGAACAGACTCAAGAAAGAACAGCCTGAAACTGCCTCTTACCGCAACCGCAAACTGA
CGGAATCCAATATAGAAGAATGGAAAGCGCTGATGGCGGAGGCAAGAGAAATCGGCTT
GTCTGTCCATGAAGTCAAATCCTTTTTAAAAACAAAGGGAAGA（配列番号３）

Ｓｌｒの推定アミノ酸配列は：

【式６】

【０１４２】

MIGRIIRLYRKRKGYSINQLAVESGVSKSYLSKIERGVHTNPSVQFLKKVSATLEVELTELF
DAETMMYEKISGGEEEWRVHLVQAVQAGMEKEELFTFTNRLKKEQPETASYRNRKLTES
NIEEWKALMAEAREIGLSVHEVKSFLKTKGR（配列番号４）

１の実施態様において、Ｂ．ズブチリス１６８染色体の約３５２９０１４－３５２９６０３ｂｐで見られる配列を本発明を用いて欠失させた。ｓｌｒコード領域は染色体の約３５２９１３１から３５２９５８６で見られる。
【０１４３】
Ｂ．ズブチリス１６８のｐｈｒＣコード配列を以下に示す：
【式７】
【０１４４】

ATGAAATTGAAATCTAAGTTGTTTGTTATTTGTTTGGCCGCAGCCGCGATTTTTACAGCG
GCTGGCGTTTCTGCTAATGCGGAAGCACTCGACTTTCATGTGACAGAAAGAGGAATGA
CG（配列番号13）

ｐｈｒＣの推定アミノ酸配列は：
【式８】
【０１４５】

MKLKSKLFVICLAAAAIFTAAGVSANAEALDFHVTERGMT（配列番号14）

さらに、Ｂ．ズブチリス１６８染色体の約４２９５３１－４２９６５０ｂｐで見られるコード領域をコード配列の４２９５９１で選択マーカー挿入により不活性化させた。
【０１４６】
Ｂ．ズブチリス１６８のｓｉｇＢコード配列を以下に示す：
【式９】
【０１４７】

TTGATCATGACACAACCATCAAAAACTACGAAACTAACTAAAGATGAAGTCGATCGGCT
CATAAGCGATTACCAAACAAAGCAAGATGAACAAGCGCAGGAAACGCTTGTGCGGGTG
TATACAAATCTGGTTGACATGCTTGCGAAAAAATACTCAAAAGGCAAAAGCTTCCACGA
GGATCTCCGCCAGGTCGGCATGATCGGGCTGCTAGGCGCGATTAAGCGATACGATCC
TGTTGTCGGCAAATCGTTTGAAGCTTTTGCAATCCCGACAATCATCGGTGAAATTAAAC
GTTTCCTCAGAGATAAAACATGGAGCGTTCATGTGCCGAGACGAATTAAAGAACTCGGT
CCAAGAATCAAAATGGCGGTTGATCAGCTGACCACTGAAACACAAAGATCGCCGAAAG
TCGAAGAGATTGCCGAATTCCTCGATGTTTCTGAAGAAGAGGTTCTTGAAACGATGGAA
ATGGGCAAAAGCTATCAAGCCTTATCCGTTGACCACAGCATTGAAGCGGATTCGGACG
GAAGCACTGTCACGATTCTTGATATCGTCGGATCACAGGAGGACGGATATGAGCGGGT
CAACCAGCAATTGATGCTGCAAAGCGTGCTTCATGTCCTTTCAGACCGTGAGAAACAAA
TCATAGACCTTACGTATATTCAAAACAAAAGCCAAAAAGAAACTGGGGACATTCTCGGT
ATATCTCAAATGCACGTCTCGCGCTTGCAACGCAAAGCTGTGAAGAAGCTCAGAGAGG
CCTTGATTGAAGATCCCTCGATGGAGTTAATG（配列番号９）

ｓｉｇＢの推定アミノ酸配列は：
【式１０】
【０１４８】

MIMTQPSKTTKLTKDEVDRLISDYQTKQDEQAQETLVRVYTNLVDMLAKKYSKGKSFHED
LRQVGMIGLLGAIKRYDPVVGKSFEAFAIPTIIGEIKRFLRDKTWSVHVPRRIKELGPRIKMA
VDQLTTETQRSPKVEEIAEFLDVSEEEVLETMEMGKSYQALSVDHSIEADSDGSTVTILDI
VGSQEDGYERVNQQLMLQSVLHVLSDREKQIIDLTYIQNKSQKETGDILGISQMHVSRLQ
RKAVKKLREALIEDPSMELM（配列番号10）

さらに、当該コード配列はＢ．ズブチリス１６８染色体の約５２２４１７から５２３２０８５ｂｐで見られる。

【０１４９】

Ｂ．ズブチリス１６８のｓｐｏｌｌＳＡコード配列を以下に示す：

【式１１】

【０１５０】

ATGGTTTTATTCTTTCAGATCATGGTCTGGTGCATCGTGGCCGGACTGGGGTTATACGT
GTATGCCACGTGGCGTTTCGAAGCGAAGGTCAAAGAAAAAATGTCCGCCATTCGGAAA
ACTTGGTATTTGCTGTTTGTTCTGGGCGCTATGGTATACTGGACATATGAGCCCACTTC
CCTATTTACCCACTGGGAACGGTATCTCATTGTCGCAGTCAGTTTTGCTTTGATTGATG
CTTTTATCTTCTTAAGTGCATATGTCAAAAAACTGGCCGGCAGCGAGCTTGAAACAGAC
ACAAGAGAAATTCTTGAAGAAAACAACGAAATGCTCCACATGTATCTCAATCGGCTGAA
AACATACCAATACCTATTGAAAAACGAACCGATCCATGTTTATTATGGAAGTATAGATGC
TTATGCTGAAGGTATTGATAAGCTGCTGAAAACCTATGCTGATAAAATGAACTTAACGG
CTTCTCTTTGCCACTATTCGACACAGGCTGATAAAGACCGGTTAACCGAGCATATGGAT
GATCCGGCAGATGTACAAACACGGCTCGATCGAAAGGATGTTTATTACGACCAATACG
GAAAAGTGGTTCTCATCCCTTTTACCATCGAGACACAGAACTATGTCATCAAGCTGACG
TCTGACAGCATTGTCACGGAATTTGATTATTTGCTATTTACGTCATTAACGAGCATATAT
GATTTGGTGCTGCCAATTGAGGAGGAAGGTGAAGGA（配列番号11）

ｓｐｏｌｌＳＡの推定アミノ酸配列は：

【式１２】

【０１５１】

MVLFFQIMVWCIVAGLGLYVYATWRFEAKVKEKMSAIRKTWYLLFVLGAMVYWTYEPTSL
FTHWERYLIVAVSFALIDAFIFLSAYVKKLAGSELETDTREILEENNEMLHMYLNRLKTYQY
LLKNEPIHVYYGSIDAYAEGIDKLLKTYADKMNLTASLCHYSTQADKDRLTEHMDDPADV
QTRLDRKDVYYDQYGKVVLIPFTIETQNYVIKLTSDSIVTEFDYLLFTSLTSIYDLVLPIEEEG
EG（配列番号12）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約１３４７５８７から１３４８７１４ｂｐで見られる。

【０１５２】

Ｂ．ズブチリス１６８のｃｓｎコード配列を以下に示す：

【式１３】

【０１５３】

ATGAAAATCAGTATGCAAAAAGCAGATTTTTGGAAAAAAGCAGCGATCTCATTACTTGTT
TTCACCATGTTTTTTACCCTGATGATGAGCGAAACGGTTTTTGCGGCGGGACTGAATAA
AGATCAAAAGCGCCGGGCGGAACAGCTGACAAGTATCTTTGAAAACGGCACAACGGA
GATCCAATATGGATATGTAGAGCGATTGGATGACGGGCGAGGCTATACATGCGGACGG
GCAGGCTTTACAACGGCTACCGGGGATGCATTGGAAGTAGTGGAAGTATACACAAAGG
CAGTTCCGAATAACAAACTGAAAAAGTATCTGCCTGAATTGCGCCGTCTGGCCAAGGA
AGAAAGCGATGATACAAGCAATCTCAAGGGATTCGCTTCTGCCTGGAAGTCGCTTGCA
AATGATAAGGAATTTCGCGCCGCTCAAGACAAAGTAAATGACCATTTGTATTATCAGCC
TGCCATGAAACGATCGGATAATGCCGGACTAAAAACAGCATTGGCAAGAGCTGTGATG
TACGATACGGTTATTCAGCATGGCGATGGTGATGACCCTGACTCTTTTTATGCCTTGAT
TAAACGTACGAACAAAAAAGCGGGCGGATCACCTAAAGACGGAATAGACGAGAAGAAG
TGGTTGAATAAATTCTTGGACGTACGCTATGACGATCTGATGAATCCGGCCAATCATGA
CACCCGTGACGAATGGAGAGAATCAGTTGCCCGTGTGGACGTGCTTCGCTCTATCGCC
AAGGAGAACAACTATAATCTAAACGGACCGATTCATGTTCGTTCAAACGAGTACGGTAA
TTTTGTAATCAAA（配列番号７）

Ｃｓｎの推定アミノ酸配列は：

【式１４】

【０１５４】

MKISMQKADFWKKAAISLLVFTMFFTLMMSETVFAAGLNKDQKRRAEQLTSIFENGTTEIQ
YGYVERLDDGRGYTCGRAGFTTATGDALEVVEVYTKAVPNNKLKKYLPELRRLAKEESD
DTSNLKGFASAWKSLANDKEFRAAQDKVNDHLYYQPAMKRSDNAGLKTALARAVMYDT
VIQHGDGDDPDSFYALIKRTNKKAGGSPKDGIDEKKWLNKFLDVRYDDLMNPANHDTRD
EWRESVARVDVLRSIAKENNYNLNGPIHVRSNEYGNFVIK（配列番号８）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約２７４７２１３から２７４８０４３ｂｐで見られる。

【０１５５】

Ｂ．ズブチリス１６８のｙｂｃＯコード配列を以下に示す：

【式１５】

【０１５６】

ATGAAAAGAAACCAAAAAGAATGGGAATCTGTGAGTAAAAAAGGACTTATGAAGCCGG
GAGGTACTTCGATTGTGAAAGCTGCTGGCTGCATGGGCTGTTGGGCCTCGAAGAGTAT
TGCTATGACACGTGTTTGTGCACTTCCGCATCCTGCTATGAGAGCTATT（配列番号５）

ｙｂｃＯの推定アミノ酸配列は：

【式１６】

【０１５７】

MKRNQKEWESVSKKGLMKPGGTSIVKAAGCMGCWASKSIAMTRVCALPHPAMRAI
（配列番号６）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約２１３９２６から２１４０９０ｂｐで見られる。

【０１５８】

Ｂ．ズブチリス１６８のｒａｐＡコード配列を以下に示す：

【式１７】

【０１５９】

TTGAGGATGAAGCAGACGATTCCGTCCTCTTATGTCGGGCTTAAAATTAATGAATGGTA
TACTCATATCCGGCAGTTCCACGTCGCTGAAGCCGAACGGGTCAAGCTCGAAGTAGAA
AGAGAAATTGAGGATATGGAAGAAGACCAAGATTTGCTGCTGTATTATTCTTTAATGGA
GTTCAGGCACCGTGTCATGCTGGATTACATTAAGCCTTTTGGAGAGGACACGTCGCAG
CTAGAGTTTTCAGAATTGTTAGAAGACATCGAAGGGAATCAGTACAAGCTGACAGGGCT
TCTCGAATATTACTTTAATTTTTTTCGAGGAATGTATGAATTTAAGCAGAAGATGTTTGTC
AGTGCCATGATGTATTATAAACGGGCAGAAAAGAATCTTGCCCTCGTCTCGGATGATAT
TGAGAAAGCAGAGTTTGCTTTTAAAATGGCTGAGATTTTTTACAATTTAAAACAAACCTA
TGTTTCGATGAGCTACGCCGTTCAGGCATTAGAAACATACCAAATGTATGAAACGTACA
CCGTCCGCAGAATCCAATGTGAATTCGTTATTGCAGGTAATTATGATGATATGCAGTAT
CCAGAAAGAGCATTGCCCCACTTAGAACTGGCTTTAGATCTTGCAAAGAAAGAAGGCA
ATCCCCGCCTGATCAGTTCTGCCCTATATAATCTCGGAAACTGCTATGAGAAAATGGGT
GAACTGCAAAAGGCAGCCGAATACTTTGGGAAATCTGTTTCTATTTGCAAGTCGGAAAA
GTTCGATAATCTTCCGCATTCTATCTACTCTTTAACACAAGTTCTGTATAAACAAAAAAAT
GACGCCGAAGCGCAAAAAAAGTATCGTGAAGGATTGGAAATCGCCCGTCAATACAGTG
ATGAATTATTTGTGGAGCTTTTTCAATTTTTACATGCGTTATACGGAAAAAACATTGACA
CAGAATCAGTCTCACACACCTTTCAATTTCTTGAAGAACATATGCTGTATCCTTATATTG
AAGAGCTGGCGCATGATGCTGCCCAATTCTATATAGAAAACGGACAGCCCGAAAAAGC
ACTTTCATTTTATGAGAAAATGGTGCACGCACAAAAACAAATCCAGAGAGGAGATTGTT
TATATGAAATC（配列番号15）

ＲａｐＡの推定アミノ酸配列は：

【式１８】

【０１６０】

MRMKQTIPSSYVGLKINEWYTHIRQFHVAEAERVKLEVEREIEDMEEDQDLLLYYSLMEF
RHRVMLDYIKPFGEDTSQLEFSELLEDIEGNQYKLTGLLEYYFNFFRGMYEFKQKMFVSA
MMYYKRAEKNLALVSDDIEKAEFAFKMAEIFYNLKQTYVSMSYAVQALETYQMYETYTVR
RIQCEFVIAGNYDDMQYPERALPHLELALDLAKKEGNPRLISSALYNLGNCYEKMGELQK
AAEYFGKSVSICKSEKFDNLPHSIYSLTQVLYKQKNDAEAQKKYREGLEIARQYSDELFVE
LFQFLHALYGKNIDTESVSHTFQFLEEHMLYPYIEELAHDAAQFYIENGQPEKALSFYEKM
VHAQKQIQRGDCLYEI（配列番号16）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約１３１５１７９から１３１６３１２ｂｐで見られる。

【０１６１】

Ｂ．ズブチリス１６８のＣｓｓコード配列を以下に示す：

【式１９】

【０１６２】

ATGAAAAACAAGCCGCTCGCGTTTCAGATATGGGTTGTCATATCCGGCATCCTGTTAG
CGATATCGATTTTACTGCTTGTGTTATTTTCAAACACGCTGCGAGATTTTTTCACTAAT
GAAACGTATACGACGATTGAAAATGAGCAGCATGTTCTGACAGAGTACCGCCTGCCA
GGTTCGATTGAAAGGCGCTATTACAGCGAGGAAGCGACGGCGCCGACAACTGTCCG
CTCCGTACAGCACGTGCTCCTTCCTGAAAATGAAGAGGCTTCTTCAGACAAGGATTTA
AGCATTCTGTCATCTTCATTTATCCACAAGGTGTACAAGCTGGCTGATAAGCAGGAAG
CTAAAAAGAAACGTTACAGCGCCGACGTCAATGGAGAGAAAGTGTTTTTTGTCATTAA
AAAGGGACTTTCCGTCAATGGACAATCAGCGATGATGCTCTCTTACGCGCTTGATTCT
TATCGGGACGATTTGGCCTATACCTTGTTCAAACAGCTTCTGTTTATTATAGCTGTCGT
CATTTTATTAAGCTGGATTCCGGCTATTTGGCTTGCAAAGTATTTATCAAGGCCTCTTG
TATCATTTGAAAAACACGTCAAACGGATTTCTGAACAGGATTGGGATGACCCAGTAAA
AGTGGACCGGAAAGATGAAATCGGCAAATTGGGCCATACCATCGAAGAGATGCGCC
AAAAGCTTGTGCAAAAGGATGAAACAGAAAGAACTCTATTGCAAAATATCTCTCATGA
TTTAAAAACGCCGGTCATGGTCATCAGAGGCTATACACAATCAATTAAAGACGGGATT
TTTCCTAAAGGAGACCTTGAAAACACTGTAGATGTTATTGAATGCGAAGCTCTTAAGC
TGGAGAAAAAAATAAAGGATTTATTATATTTAACGAAGCTGGATTATTTAGCGAAGCAA
AAAGTGCAGCACGACATGTTCAGTATTGTGGAAGTGACAGAAGAAGTCATCGAACGA
TTGAAGTGGGCGCGGAAAGAACTATCGTGGGAAATTGATGTAGAAGAGGATATTTTG
ATGCCGGGCGATCCGGAGCAATGGAACAAACTCCTCGAAAACATTTTGGAAAATCAA
ATCCGCTATGCTGAGACAAAAATAGAAATCAGCATGAAACAAGATGATCGAAATATCG
TGATCACCATTAAAAATGACGGTCCGCATATTGAAGATGAGATGCTCTCCAGCCTCTA
TGAGCCTTTTAATAAAGGGAAGAAAGGCGAATTCGGCATTGGTCTAAGCATCGTAAAA
CGAATTTTAACTCTTCATAAGGCATCTATCTCAATTGAAAATGACAAAACGGGTGTATC
ATACCGCATAGCAGTGCCAAAA (配列番号17)

Ｃｓｓの推定アミノ酸配列は（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番Ｏ３２１９３）：
【式２０】
【０１６３】

MKNKPLAFQI WVVISGILLAISILLLVLFSNTLRDFFTNETYTTIENEQHVLTEYRLPGSIE
RRYYSEEATAPTTVRSVQ HVLLPENEEASSDKDLSILS SSFIHKVYKLADKQEAKKKR
YSADVNGEKVFFVIKKGLSVNGQSAMMLSYALDSYRDDLAYTLFKQLLFIIAVVILLSWIPAI
WLAKYLSRPLVSFEKHVKRISEQDWDDPVKVDRKDEIGKLGHTIEEMRQKLVQKDETER
TLLQNISHDLKTPVMVIRGYTQSIKDGIFPKGDLENTVDVIECEALKLEKKIKDLLYLTKLDY
LAKQKVQHDMFSIVEVTEEVIERLKWARKELSWEIVEEDILMPGDPEQWNKLLENILENQI
RYAETKIEISMKQDDRNIVITIKNDGPHIEDEMLSSLYEPFNKGKKGEFGIGLSIVKRILTLHK
ASISIENDKTGVSYRIAVPK (配列番号18)

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約３３８４６１２から３３８６７７４ｂｐで見られる。
【０１６４】
Ｂ．ズブチリス１６８のＦｂｐタンパク質（フルクトース－１，６－ビオオスファターゼ（ｂｉｏｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ））のｆｂｐコード配列を以下に示す：
【式２１】
【０１６５】

ATGTTTAAAAATAATGTCATACTTTTAAATTCACCTTATCATGCACATGCTCATAAAGA
GGGGTTTATTCTAAAAAGGGGATGGACGGTTTTGGAAAGCAAGTACCTAGATCTACT
CGCACAAAAATACGATTGTGAAGAAAAAGTGGTAACAGAAATCATCAATTTGAAAGCG
ATATTGAACCTGCCAAAAGGCACCGAGCATTTTGTCAGTGATCTGCACGGAGAGTAT
CAGGCATTCCAGCACGTGTTGCGCAATGGTTCAGGACGAGTCAAAGAGAAGATACG
CGACATCTTCAGCGGTGTCATTTACGATAGAGAAATTGATGAATTAGCAGCATTGGTC
TATTATCCGGAAGACAAACTGAAATTAATCAAACATGACTTTGATGCGAAAGAAGCGT
TAAACGAGTGGTATAAAGAAACGATTCATCGAATGATTAAGCTCGTTTCATATTGCTC
CTCTAAGTATACCCGCTCCAAATTACGCAAAGCACTGCCTGCCCAATTTGCTTATATT
ACGGAGGAGCTGTTATACAAAACAGAACAAGCTGGCAACAAGGAGCAATATTACTCC
GAAATCATTGATCAGATCATTGAACTTGGCCAAGCCGATAAGCTGATCACCGGCCTT
GCTTACAGCGTTCAGCGATTGGTGGTCGACCATCTGCATGTGGTCGGCGATATTTAT
GACCGCGGCCCGCAGCCGGATAGAATTATGGAAGAACTGATCAACTATCATTCTGTC
GATATTCAGTGGGGAAATCACGATGTCCTTTGGATCGGCGCCTATTCCGGTTCCAAA
GTGTGCCTGGCCAATATTATCCGCATCTGTGCCCGCTACGACAACCTGGATATTATTG
AGGACGTGTACGGCATCAACCTGAGACCGCTGCTGAACCTGGCCGAAAAATATTATG
ATGATAATCCAGCGTTCCGTCCAAAAGCAGACGAAAACAGG
CCAGAGGATGAGATTAAGCAAATCACAAAAATCCATCAAGCGATTGCCATGATCCAAT
TCAAGCTTGAGAGCCCGATTATCAAGAGACGGCCGAACTTTAATATGGAAGAGCGGC
TGTTATTAGAGAAAATAGACTATGACAAAAATGAAATCACGCTGAACGGAAAAACATA
TCAACTGGAAAACACCTGCTTTGCGACGATTAATCCGGAGCAGCCAGATCAGCTATT
AGAAGAAGAAGCAGAAGTCATAGACAAGCTGCTATTCTCTGTCCAGCATTCCGAAAA
GCTGGGCCGCCATATGAATTTTATGATGAAAAAAGGCAGCCTTTATTTAAAATATAAC
GGCAACCTGTTGATTCACGGCTGTATTCCAGTTGATGAAAACGGCAATATGGAAACG
ATGATGATTGAGGATAAACCGTATGCGGGCCGTGAGCTGCTCGATGTATTTGAACGA
TTCTTGCGGGAAGCCTTTGCCCACCCGGAAGAAACCGATGACCTGGCGACAGATATG
GCTTGGTATTTATGGACAGGCGAATACTCCTCCCTCTTCGGAAAACGCGCCATGACG
ACATTTGAGCGCTATTTCATCAAAGAGAAGGAAACGCATAAAGAGAAGAAAAACCCGT
ATTATTATTTACGAGAAGACGAGGCAACCTGCCGAAACATCCTGGCAGAATTCGGCC
TCAATCCAGATCACGGCCATATCATCAACGGCCATACACCTGTAAAAGAAATCGAAG
GAGAAGACCCAATCAAAGCAAACGGAAAAATGATCGTCATCGACGGCGGCTTCTCCA
AAGCCTACCAATCCACAACAGGCATCGCCGGCTACACGCTGCTATACAACTCCTACG
GCATGCAGCTCGTCGCCCATAAACACTTCAATTCCAAGGCAGAAGTCCTAAGCACCG
GAACCGACGTCTTAACGGTCAAACGATTAGTGGACAAAGAGCTTGAGCGGAAGAAAG
TGAAGGAAACGAATGTGGGTGAGGAATTGTTGCAGGAAGTTGCGATTTTAGAGAGTT
TGCGGGAGTATCGGTATATGAAG（配列番号 19）

Ｆｂｐタンパク質の推定アミノ酸配列は：
【式２２】
【０１６６】

MFKNNVILLNSPYHAHAHKEGFILKRGWTVLESKYLDLLAQKYDCEEKVVTEIINLKAILNL
PKGTEHFVSDLHGEYQAFQHVLRNGSGRVKEKIRDIFSGVIYDREIDELAALVYYPED
KLKLIKHDFDAKEALNEWYKETIHRMIKLVSYCSSKYTRSKLRKALPAQFAYITEELLYK
TEQAGNKEQYYSEIIDQIIELGQADKLITGLAYSVQRLVVDHLHVVGDIYDRGPQPDRIM
EELINYHSVDIQWGNHDVLWIGAYSGSKVCLANIIRICARYDNLDIIEDVYGINLRPLLN
LAEKYYDDNPAFRPKADENRPEDEIKQITKIHQAIAMIQFKLESPIIKRRPNFNMEERLL
LEKIDYDKNEITLNGKTYQLENTCFATINPEQPDQLLEEEAEVIDKLLFSVQHSEKLGRH
MNFMMKKGSLYLKYNGNLLIHGCIPVDENGNMETMMIEDKPYAGRELLDVFERFLREAF
AHPEETDDLATDMAWYLWTGEYSSLFGKRAMTTFERYFIKEKETHKEKKNPYYYLREDE
ATCRNILAEFGLNPDHGHIINGHTPVKEIEGEDPIKANGKMIVIDGGFSKAYQSTTGIAGYT
LLYNSYGMQLVAHKHFNSKAEVLSTGTDVLTVKRLVDKELERKKVKETNVGEELLQEVAI
LESLREYRYMK（配列番号 20）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約４１２７０５３から４１２

９０６５ｂｐで見られる。

【０１６７】

Ｂ．ズブチリス１６８のａｌｓＤタンパク質（α－アセト乳酸デカルボキシラーゼ）のａｌｓＤコード配列を以下に示す：

【式２３】

【０１６８】

ATGAAACGAGAAAGCAACATTCAAGTGCTCAGCCGTGGTCAAAAAGATCAGCCTGTG
AGCCAGATTTATCAAGTATCAACAATGACTTCTCTATTAGACGGAGTATATGACGGAG
ATTTTGAACTGTCAGAGATTCCGAAATATGGAGACTTCGGTATCGGAACCTTTAACAA
GCTTGACGGAGAGCTGATTGGGTTTGACGGCGAATTTTACCGTCTTCGCTCAGACGG
AACCGCGACACCGGTCCAAAATGGAGACCGTTCACCGTTCTGTTCATTTACGTTCTTT
ACACCGGACATGACGCACAAAATTGATGCGAAAATGACACGCGAAGACTTTGAAAAA
GAGATCAACAGCATGCTGCCAAGCAGAAACTTATTTTATGCAATTCGCATTGACGGAT
TGTTTAAAAAGGTGCAGACAAGAACAGTAGAACTTCAAGAAAAACCTTACGTGCCAAT
GGTTGAAGCGGTCAAAACACAGCCGATTTTCAACTTCGACAACGTGAGAGGAACGAT
TGTAGGTTTCTTGACACCAGCTTATGCAAACGGAATCGCCGTTTCTGGCTATCACCTG
CACTTCATTGACGAAGGACGCAATTCAGGCGGACACGTTTTTGACTATGTGCTTGAG
GATTGCACGGTTACGATTTCTCAAAAAATGAACATGAATCTCAGACTTCCGAACACAG
CGGATTTCTTTAATGCGAATCTGGATAACCCTGATTTTGCGAAAGATATCGAAACAAC
TGAAGGAAGCCCTGAA（配列番号21）

ａｌｓＤタンパク質配列の推定アミノ酸配列は：

【式２４】

【０１６９】

MKRESNIQVLSRGQKDQPVSQIYQVSTMTSLLDGVYDGDFELSEIPKYGDFGIGTFNKLD
GELIGFDGEFYRLRSDGTATPVQNGDRSPFCSFTFFTPDMTHKIDAKMTREDFEKEINSM
LPSRNLFYAIRIDGLFKKVQTRTVELQEKPYVPMVEAVKTQPIFNFDNVRGTIVGFLTPAYA
NGIAVSGYHLHFIDEGRNSGGHVFDYVLEDCTVTISQKMNMNLRLPNTADFFNANLDNPD
FAKDIETTEGSPE（配列番号22）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約３７０７８２９から３７０８５９３ｂｐで見られる。

【０１７０】

Ｂ．ズブチリス１６８のｇａｐＢタンパク質（グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ）のｇａｐＢコード配列を以下に示す：

【式２５】

【０１７１】

ATGAAGGTAAAAGTAGCGATCAACGGGTTTGGAAGAATCGGAAGAATGGTTTTTAGA
AAAGCGATGTTAGACGATCAAATTCAAGTAGTGGCCATTAACGCCAGCTATTCCGCA
GAAACGCTGGCTCATTTAATAAAGTATGACACAATTCACGGCAGATACGACAAAGAG
GTTGTGGCTGGTGAAGATAGCCTGATCGTAAATGGAAAGAAAGTGCTTTTGTTAAACA
GCCGTGATCCAAAACAGCTGCCTTGGCGGGAATATGATATTGACATAGTCGTCGAAG
CAACAGGGAAGTTTAATGCTAAAGATAAAGCGATGGGCCATATAGAAGCAGGTGCAA
AAAAAGTGATTTTGACCGCTCCGGGAAAAAATGAAGACGTTACCATTGTGATGGGCG
TAAATGAGGACCAATTCGACGCTGAGCGCCATGTCATTATTTCAAATGCGTCATGCAC
GACAAATTGCCTTGCGCCTGTTGTAAAAGTGCTGGATGAAGAGTTTGGCATTGAGAG
CGGTCTGATGACTACAGTTCATGCGTATACGAATGACCAAAAAAATATTGATAACCCG
CACAAAGATTTGCGCCGGGCGCGGGCTTGCGGTGAATCCATCATTCCAACAACAACA
GGAGCGGCAAAGGCGCTTTCGCTTGTGCTGCCGCATCTGAAAGGAAAACTTCACGG
CCTCGCCTTGCGTGTCCCTGTTCCGAACGTCTCATTGGTTGATCTCGTTGTTGATCTG
AAAACGGATGTTACGGCTGAAGAAGTAAACGAGGCATTTAAACGCGCTGCCAAAACG
TCGATGTACGGTGTACTTGATTACTCAGATGAACCGCTC
GTTTCGACTGATTATAATACGAATCCGCATTCAGCGGTCATTGACGGGCTTACAACAA
TGGTAATGGAAGACAGGAAAGTAAAGGTGCTGGCGTGGTATGACAACGAATGGGGC
TACTCCTGCAGAGTTGTTGATCTAATCCGCCATGTAGCGGCACGAATGAAACATCCG
TCTGCTGTA (配列番号23)

ＧａｐＢタンパク質の推定アミノ酸配列は：

【式２６】

【０１７２】

MKVKVAINGFGRIGRMVFRKAMLDDQIQVVAINASYSAETLAHLIKYDTIHGRYDKEVVA
GEDSLIVNGKKVLLLNSRDPKQLPWREYDIDIVVEATGKFNAKDKAMGHIEAGAKKVILT
APGKNEDVTIVMGVNEDQFDAERHVIISNASCTTNCLAPVVKVLDEEFGIESGLMTTVHAY
TNDQKNIDNPHKDLRRARACGESIIPTTTGAAKALSLVLPHLKGKLHGLALRVPVPNVSLV
DLVVDLKTDVTAEEVNEAFKRAAKTSMYGVLDYSDEPLVSTDYNTNPHSAVIDGLTTMVM
EDRKVKVLAWYDNEWGYSCRVVDLIRHVAARMKHPSAV (配列番号24)

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約２９６６０７５から２９６７０９４ｂｐで見られる。

【０１７３】

Ｋｂｌタンパク質（２－アミノ－３－ケトブチラートＣｏＡリガーゼ）のＫｂｌコード配列を以下に示す：

【式２７】

【０１７４】

ATGACGAAGGAATTTGAGTTTTTAAAAGCAGAGCTTAATAGTATGAAAGAAAACCATA
CATGGCAAGACATAAAACAGCTTGAATCTATGCAGGGCCCATCTGTCACAGTGAATC
ACCAAAAAGTCATTCAGCTATCTTCTAATAATTACCTCGGATTCACTTCACATCCTAGA
CTCATCAACGCCGCACAGGAGGCCGTTCAGCAGTATGGAGCCGGCACCGGATCAGT
GAGAACGATTGCGGGTACATTTACAATGCATCAAGAGCTTGAGAAAAAGCTGGCAGC
CTTTAAAAAAACGGAGGCGGCACTTGTATTCCAATCAGGCTTCACAACAAACCAAGG
CGTACTTTCAAGTATTCTATCAAAAGAGGACATTGTCATCTCAGATGAATTGAACCAT
GCCTCTATTATTGACGGAATTCGACTGACAAAGGCGGATAAAAAGGTGTATCAGCAC
GTCAATATGAGTGATTTAGAGCGGGTGCTGAGAAAGTCAATGAATTATCGGATGCGT
CTGATTGTGACAGACGGCGTATTTTCCATGGATGGCAACATAGCTCCTCTGCCTGATA
TTGTAGAGCTCGCTGAGAAATATGACGCATTTGTGATGGTGGATGACGCCCATGCAT
CCGGAGTACTTGGCGAAAACGGCAGGGGAACGGTGAATCACTTCGGTCTTGACGGC
AGAGTGCATATTCAGGTCGGAACATTAAGCAAGGCAATCGGAGTGCTCGGCGGCTA
CGCTGCAGGTTCAAAGGTGCTGATCGATTATTTGCGCCATAAAGGCCGTCCATTTTTA
TTCAGCACATCTCATCCGCCGGCAGTCACTGCAGCTTGTATGGAAGCGATTGATGTC
TTGCTTGAAGAGCCGGAGCATATGGAGCGCTTGTGGGAGAATACTGCCTATTTTAAA
GCAATGCTTGTGAAAATGGGTCTGACTCTCACGAAGAGTGAAACGCCGATTCTTCCT
ATTTTAATAGGTGATGAAGGTGTGGCAAAGCAATTTTCAGATCAGCTCCTTTCTCGCG
GTGTTTTTGCCCAAAGTATCGTTTTCCCGACTGTAGCAAAGGGAAAAGCCAGAATTCG
CACGATTATAACAGCAGAGCACACCAAAGATGAACTGGATCAGGCGCTTGATGTCAT
CGAAAAGACGGCAAAGGAGCTCCAGCTATTG（配列番号25）

Ｋｂｌタンパク質の推定アミノ酸配列は：
【式２８】
【０１７５】

MTKEFEFLKAELNSMKENHTWQDIKQLESMQGPSVTVNHQKVIQLSSNNYLGFTSHPRLI
NAAQEAVQQYGAGTGSVRTIAGTFTMHQELEKKLAAFKKTEAALVFQSGFTTNQGVLSSI
LSKEDIVISDELNHASIIDGIRLTKADKKVYQHVNMSDLERVLRKSMNYRMRLIVTDGVFS
MDGNIAPLPDIVELAEKYDAFVMVDDAHASGVLGENGRGTVNHFGLDGRVHIQVGTLSK
AIGVLGGYAAGSKVLIDYLRHKGRPFLFSTSHPPAVTAACMEAIDVLLEEPEHMERLWEN
TAYFKAMLVKMGLTLTKSETPILPILIGDEGVAKQFSDQLLSRGVFAQSIVFPTVAKGKARI
RTIITAEHTKDELDQALDVIEKTAKELQLL（配列番号26）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約１７７０７８７から１７７１９６２ｂｐで見られる。
【０１７６】
Ｂ．ズブチリス１６８のＰｃｋＡ（ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ）のＰｃｋＡコード配列を以下に示す：
【式２９】
【０１７７】

ATGAACTCAGTTGATTTGACCGCTGATTTACAAGCCTTATTAACATGTCCAAATGTGC
GTCATAATTTATCAGCAGCACAGCTAACAGAAAAAGTCCTCTCCCGAAACGAAGGCAT
TTTAACATCCACAGGTGCTGTTCGCGCGACAACAGGCGCTTACACAGGACGCTCACC
TAAAGATAAATTCATCGTGGAGGAAGAAAGCACGAAAAATAAGATCGATTGGGGCCC
GGTGAATCAGCCGATTTCAGAAGAAGCGTTTGAGCGGCTGTACACGAAAGTTGTCAG
CTATTTAAAGGAGCGAGATGAACTGTTTGTTTTCGAAGGATTTGCCGGAGCAGACGA
GAAATACAGGCTGCCGATCACTGTCGTAAATGAGTTCGCATGGCACAATTTATTTGCG
CGGCAGCTGTTTATCCGTCCGGAAGGAAATGATAAGAAAACAGTTGAGCAGCCGTTC
ACCATTCTTTCTGCTCCGCATTTCAAAGCGGATCCAAAAACAGACGGCACTCATTCCG
AAACGTTTATTATTGTCTCTTTCGAAAAGCGGACAATTTTAATCGGCGGAACTGAGTA
TGCCGGTGAAATGAAGAAGTCCATTTTCTCCATTATGAATTTCCTGCTGCCTGAAAGA
GATATTTTATCTATGCACTGCTCCGCCAATGTCGGTGAAAAAGGCGATGTCGCCCTTT
TCTTCGGACTGTCAGGAACAGGAAAGACCACCCTGTCGGCAGATGCTGACCGCAAG
CTGATCGGTGACGATGAACATGGCTGGTCTGATACAGGCGTCTTTAATATTGAAGGC
GGATGCTACGCTAAGTGTATTCATTTAAGCGAGGAAAAGGAGCCGCAAATCTTTAAC
GCGATCCGCTTCGGGTCTGTTCTCGAAAATGTCGTTGTGGATGAAGATACACGCGAA
GCCAATTATGATGATTCCTTCTATACTGAAAACACGCGGGCAGCTTACCCGATTCATA
TGATTAATAACATCGTGACTCCAAGCATGGCCGGCCATCCGTCAGCCATTGTATTTTT
GACGGCTGATGCCTTCGGAGTCCTGCCGCCGATCAGCAAACTAACGAAGGAGCAGG
TGATGTACCATTTTTTGAGCGGTTACACGAGTAAGCTTGCCGGAACCGAACGTGGTG
TCACGTCTCCTGAAACGACGTTTTCTACATGCTTCGGCTCACCGTTCCTGCCGCTTCC
TGCTCACGTCTATGCTGAAATGCTCGGCAAAAAGATCGATGAACACGGCGCAGACGT
TTTCTTAGTCAATACCGGATGGACCGGGGGCGGCTACGGCACAGGCGAACGAATGA
AGCTTTCTTACACTAGAGCAATGGTCAAAGCAGCGATTGAAGGCAAATTAGAGGATG
CTGAAATGATAACTGACGATATTTTCGGCCTGCACATTCCGGCCCATGTTCCTGGCGT
TCCTGATCATATCCTTCAGCCTGAAAACACGTGGACCAACAAGGAAGAATACAAAGAA
AAAGCAGTCTACCTTGCAAATGAATTCAAAGAGAACTTTAAAAAGTTCGCACATACCG
ATGCCATCGCCCAGGCAGGCGGCCCTCTCGTA（配列番号27）

ＰｃｋＡタンパク質の推定アミノ酸配列は：
【式３０】
【０１７８】

MNSVDLTADLQALLTCPNVRHNLSAAQLTEKVLSRNEGILTSTGAVRATTGAYTGRSPKD
KFIVEEESTKNKIDWGPVNQPISEEAFERLYTKVVSYLKERDELFVFEGFAGADEKYRLPI
TVVNEFAWHNLFARQLFIRPEGNDKKTVEQPFTILSAPHFKADPKTDGTHSETFIIVSF
EKRTILIGGTEYAGEMKKSIFSIMNFLLPERDILSMHCSANVGEKGDVALFFGLSGTGKT
TLSADADRKLIGDDEHGWSDTGVFNIEGGCYAKCIHLSEEKEPQIFNAIRFGSVLENVVV
DEDTREANYDDSFYTENTRAAYPIHMINNIVTPSMAGHPSAIVFLTADAFGVLPPISKLT
KEQVMYHFLSGYTSKLAGTERGVTSPETTFSTCFGSPFLPLPAHVYAEMLGKKIDEHGAD
VFLVNTGWTGGGYGTGERMKLSYTRAMVKAAIEGKLEDAEMITDDIFGLHIPAHVPGVPD
HILQPENTWTNKEEYKEKAVYLANEFKENFKKFAHTDAIAQAGGPLV（配列番号28）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約３１２８５７９から３１３０１５９ｂｐで見られる。
【０１７９】
Ｂ．ズブチリス１６８のｐｒｐＣタンパク質（タンパク質ホスファターゼ）のｐｒｐＣコード配列を以下に示す：
【式３１】
【０１８０】

TTGTTAACAGCCTTAAAAACAGATACAGGAAAAATCCGCCAGCATAATGAAGATGATG
CGGGGATATTCAAGGGGAAAGATGAATTTATATTAGCGGTTGTCGCTGATGGCATGG
GCGGCCATCTTGCTGGAGATGTTGCGAGCAAGATGGCTGTGAAAGCCATGGGGGAG
AAATGGAATGAAGCAGAGACGATTCCAACTGCGCCCTCGGAATGTGAAAAATGGCTC
ATTGAACAGATTCTATCGGTAAACAGCAAAATATACGATCACGCTCAAGCCCACGAAG
AATGCCAAGGCATGGGGACGACGATTGTATGTGCACTTTTTACGGGGAAAACGGTTT
CTGTTGCCCATATCGGAGACAGCAGATGCTATTTGCTTCAGGACGATGATTTCGTTCA
AGTGACAGAAGACCATTCGCTTGTAAATGAACTGGTTCGCACTGGAGAGATTTCCAG
AGAAGACGCTGAACATCATCCGCGAAAAAATGTGTTGACGAAGGCGCTTGGAACAGA
CCAGTTAGTCAGTATTGACACCCGTTCCTTTGATATAGAACCCGGAGACAAACTGCTT
CTATGTTCTGACGGACTGACAAATAAAGTGGAAGGCACTGAGTTAAAAGACATCCTG
CAAAGCGATTCAGCTCCTCAGGAAAAAGTAAACCTGCTTGTGGACAAAGCCAATCAG
AATGGCGGAGAAGACAACATTACAGCAGTTTTGCTTGAGCTTGCTTTACAAGTTGAAG
AGGGTGAAGATCAGTGC（配列番号29）

ｐｒｐＣタンパク質の推定アミノ酸配列は：

【式３２】

【０１８１】

MLTALKTDTGKIRQHNEDDAGIFKGKDEFILAVVADGMGGHLAGDVASKMAVKAMGEKW
NEAETIPTAPSECEKWLIEQILSVNSKIYDHAQAHEECQGMGTTIVCALFTGKTVSVAHIG
DSRCYLLQDDDFVQVTEDHSLVNELVRTGEISREDAEHHPRKNVLTKALGTDQLVSIDTR
SFDIEPGDKLLLCSDGLTNKVEGTELKDILQSDSAPQEKVNLLVDKANQNGGEDNITAVLL
ELALQVEEGEDQC（配列番号30）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約１６４９６８４から１６５０４４５ｂｐで見られる。

【０１８２】

Ｂ．ズブチリス１６８のｒｏｃＡタンパク質（ピロリン－５－カルボン酸デヒドロゲナーゼ）のｒｏｃＡコード配列を以下に示す：

【式３３】

【０１８３】

ATGACAGTCACATACGCGCACGAACCATTTACCGATTTTACGGAAGCAAAGAATAAAA
CTGCATTTGGGGAGTCATTGGCCTTTGTAAACACTCAGCTCGGCAAGCATTATCCGC
TTGTCATAAATGGAGAAAAAATTGAAACGGACCGCAAAATCATTTCTATTAACCCGGC
AAATAAAGAAGAGATCATTGGGTACGCGTCTACAGCGGATCAAGAGCTTGCTGAAAA
AGCGATGCAAGCCGCATTGCAGGCATTTGATTCCTGGAAAAAACAAAGACCGGAGCA
CCGCGCAAATATTCTCTTTAAGGCAGCGGCTATTTTGCGCAGAAGAAAGCATGAATTT
TCAAGCTATCTTGTGAAGGAAGCAGGAAAACCGTGGAAGGAAGCAGATGCGGACAC
GGCTGAAGCGATAGACTTTTTAGAGTTCTACGCGCGCCAAATGTTAAAGCTCAAGGA
AGGGGCTCCGGTGAAGAGCCGTGCTGGCGAGGTCAATCAATATCATTACGAAGCGC
TTGGCGTCGGCATCGTCATTTCTCCATTTAACTTCCCGCTCGCGATTATGGCGGGAA
CAGCGGTGGCAGCGATTGTGACAGGAAATACGATTCTCTTAAAACCGGCTGACGCAG
CCCCGGTAGTGGCAGCAAAATTTGTCGAGGTCATGGAGGAAGCGGGTCTGCCAAAC
GGCGTTCTGAATTACATTCCGGGAGATGGTGCGGAGATCGGTGATTTCTTAGTTGAG
CATCCGAAGACACGGTTTGTCTCATTTACAGGTTCCCGTGCAGTCGGCTGCCGGATT
TATGAGCGAGCTGCCAAAGTGCAGCCGGGCCAAAAATGGCTCAAACGGGTAATTGC
AGAAATGGGCGGAAAAGACACAGTGCTTGTCGACAAGGACGCTGATCTTGACCTTGC
TGCATCCTCTATCGTGTATTCAGCATTTGGATATTCAGGACAGAAGTGTTCTGCGGGC
TCCCGCGCGGTCATTCATCAGGATGTGTATGATGAAGTGGTGGAAAAAGCTGTGGCG
CTGACCAAAACGCTGACTGTCGGCAATCCAGAAGATCCTGATACGTATATGGGTCCC
GTGATTCATGAAGCATCCTACAACAAAGTGATGAAATACATTGAAATCGGCAAATCTG
AAGGCAAGCTATTGGCCGGCGGAGAAGGCGATGATTCAAAAGGCTACTTTATTCAGC
CGACGATCTTTGCAGATGTTGATGAAAACGCCCGCTTGATGCAGGAAGAAATTTTCG
GCCCGGTTGTTGCGATTTGCAAAGCGCGTGATTTCGATCATATGCTGGAGATTGCCA
ATAACACGGAATACGGATTAACAGGTGCGCTTCTGACGAAAAACCGTGCGCACATTG
AACGGGCGCGCGAGGATTTCCATGTCGGAAACCTATATTTTAACAGAGGATGTACCG
GAGCAATTGTCGGCTATCAGCCGTTCGGCGGTTTTAATATGTCAGGAACAGACTCAA
AAGCAGGCGGTCCCGATTACTTAATTCTTCATATGCAAGCCAAAACAACGTCCGAAG
CTTTT (配列番号31)

ＲｏｃＡタンパク質の推定アミノ酸配列は：
【式３４】
【０１８４】

MTVTYAHEPFTDFTEAKNKTAFGESLAFVNTQLGKHYPLVINGEKIETDRKIISINPANK
EEIIGYASTADQELAEKAMQAALQAFDSWKKQRPEHRANILFKAAAILRRRKHEFSSYLV
KEAGKPWKEADADTAEAIDFLEFYARQMLKLKEGAPVKSRAGEVNQYHYEALGVGIVISP
FNFPLAIMAGTAVAAIVTGNTILLKPADAAPVVAAKFVEVMEEAGLPNGVLNYIPGDGAEIG
DFLVEHPKTRFVSFTGSRAVGCRIYERAAKVQPGQKWLKRVIAEMGGKDTVLVDKDADL
DLAASSIVYSAFGYSGQKCSAGSRAVIHQDVYDEVVEKAVALTKTLTVGNPEDPDTYMG
PVIHEASYNKVMKYIEIGKSEGKLLAGGEGDDSKGYFIQPTIFADVDENARLMQEEIFGPV
VAICKARDFDHMLEIANNTEYGLTGALLTKNRAHIERAREDFHVGNLYFNRGCTGAIVGY
QPFGGFNMSGTDSKAGGPDYLILHMQAKTTSEAF (配列番号32)

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約３８７７９９１から３８７９５３５ｂｐで見られる。
【０１８５】
Ｂ．ズブチリス１６８のｒｏｃＤタンパク質（オルニチンアミノトランスフェラーゼ）のｒｏｃＤコード配列を以下に示す：
【式３５】
【０１８６】

ATGACAGCTTTATCTAAATCCAAAGAAATTATTGATCAGACGTCTCATTACGGAGCCA
ACAATTATCACCCGCTCCCGATTGTTATTTCTGAAGCGCTGGGTGCTTGGGTAAAGG
ACCCGGAAGGCAATGAATATATGGATATGCTGAGTGCTTACTCTGCGGTAAACCAGG
GGCACAGACACCCGAAAATCATTCAGGCATTAAAGGATCAGGCTGATAAAATCACCC
TCACGTCACGCGCGTTTCATAACGATCAGCTTGGGCCGTTTTACGAAAAAACAGCTAA
ACTGACAGGCAAAGAGATGATTCTGCCGATGAATACAGGAGCCGAAGCGGTTGAATC
CGCGGTGAAAGCGGCGAGACGCTGGGCGTATGAAGTGAAGGGCGTAGCTGACAAT
CAAGCGGAAATTATCGCATGTGTCGGGAACTTCCACGGCCGCACGATGCTGGCGGT
ATCTCTTTCTTCTGAAGAGGAATATAAACGAGGATTCGGCCCGATGCTTCCAGGAATC
AAACTCATTCCTTACGGCGATGTGGAAGCGCTTCGACAGGCCATTACGCCGAATACA
GCGGCATTCTTGTTTGAACCGATTCAAGGCGAAGCGGGCATTGTGATTCCGCCTGAA
GGATTTTTACAGGAAGCGGCGGCGATTTGTAAGGAAGAGAATGTCTTGTTTATTGCG
GATGAAATTCAGACGGGTCTCGGACGTACAGGCAAGACGTTTGCCTGTGACTGGGA
CGGCATTGTTCCGGATATGTATATCTTGGGCAAAGCGCTTGGCGGCGGTGTGTTCCC
GATCTCTTGCATTGCGGCGGACCGCGAGATCCTAGGCGTGTTTAACCCTGGCTCACA
CGGCTCAACATTTGGTGGAAACCCGCTTGCATGTGCAGTGTCTATCGCTTCATTAGAA
GTGCTGGAGGATGAAAAGCTGGCGGATCGTTCTCTTGAACTTGGTGAATACTTTAAA
AGCGAGCTTGAGAGTATTGACAGCCCTGTCATTAAAGAAGTCCGCGGCAGAGGGCT
GTTTATCGGTGTGGAATTGACTGAAGCGGCACGTCCGTATTGTGAGCGTTTGAAGGA
AGAGGGACTTTTATGCAAGGAAACGCATGATACAGTCATTCGTTTTGCACCGCCATTA
ATCATTTCCAAAGAGGACTTGGATTGGGCGATAGAGAAAATTAAGCACGTGCTGCGA
AACGCA (配列番号33)

ＲｏｃＤタンパク質の推定アミノ酸配列は：

【式３６】

【０１８７】

MTALSKSKEIIDQTSHYGANNYHPLPIVISEALGAWVKDPEGNEYMDMLSAYSAVNQGHR
HPKIIQALKDQADKITLTSRAFHNDQLGPFYEKTAKLTGKEMILPMNTGAEAVESAVKAAR
RWAYEVKGVADNQAEIIACVGNFHGRTMLAVSLSSEEEYKRGFGPMLPGIKLIPYGDVEA
LRQAITPNTAAFLFEPIQGEAGIVIPPEGFLQEAAAICKEENVLFIADEIQTGLGRTGK
TFACDWDGIVPDMYILGKALGGGVFPISCIAADREILGVFNPGSHGSTFGGNPLACAVSI
ASLEVLEDEKLADRSLELGEYFKSELESIDSPVIKEVRGRGLFIGVELTEAARPYCERLK
EEGLLCKETHDTVIRFAPPLIISKEDLDWAIEKIKHVLRNA (配列番号34)

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約４１４３３２８から４１４４５３０ｂｐで見られる。

【０１８８】

Ｂ．ズブチリス１６８のｒｏｃＦタンパク質（アルギナーゼ）のｒｏｃＦコード配列を以下に示す：

【式３７】

【０１８９】

ATGGATAAAACGATTTCGGTTATTGGAATGCCAATGGATTTAGGACAAGCACGACGC
GGAGTGGATATGGGCCCGAGTGCCATCCGGTACGCTCATCTGATCGAGAGGCTGTC
AGACATGGGGTATACGGTTGAAGATCTCGGTGACATTCCGATCAATCGCGAAAAAT
CAAAAATGACGAGGAACTGAAAAACCTGAATTCCGTTTTGGCGGGAAATGAAAAACT
CGCGCAAAAGGTCAACAAAGTCATTGAAGAGAAAAAATTCCCGCTTGTCCTGGGCGG
TGACCACAGTATTGCGATCGGCACGCTTGCAGGCACAGCGAAGCATTACGATAATCT
CGGCGTCATCTGGTATGACGCGCACGGCGATTTGAATACACTTGAAACTTCACCATC
GGGCAATATTCACGGCATGCCGCTCGCGGTCAGCCTAGGCATTGGCCACGAGTCAC
TGGTTAACCTTGAAGGCTACGCGCCTAAAATCAAACCGGAAAACGTCGTCATCATTG
GCGCCCGGTCACTTGATGAAGGGGAGCGCAAGTACATTAAGGAAAGCGGCATGAAG
GTGTACACAATGCACGAAATCGATCGTCTTGGCATGACAAAGGTCATTGAAGAAACC
CTTGATTATTTATCAGCATGTGATGGCGTCCATCTGAGCCTTGATCTGGACGGACTTG
ATCCGAACGACGCACCGGGTGTCGGAACCCCTGTCGTCGGCGGCATCAGCTACCGG
GAGAGCCATTTGGCTATGGAAATGCTGTATGACGCAGGCATCATTACCTCAGCCGAA
TTCGTTGAGGTTAACCCGATCCTTGATCACAAAAACAAAACGGGCAAAACAGCAGTA
GAGCTCGTAGAATCCCTGTTAGGGAAGAAGCTGCTG (配列番号35)

ＲｏｃＦタンパク質の推定アミノ酸配列は：

【式３８】

【０１９０】

MDKTISVIGMPMDLGQARRGVDMGPSAIRYAHLIERLSDMGYTVEDLGDIPINREKIKND
EELKNLNSVLAGNEKLAQKVNKVIEEKKFPLVLGGDHSIAIGTLAGTAKHYDNLGVIWYD
AHGDLNTLETSPSGNIHGMPLAVSLGIGHESLVNLEGYAPKIKPENVVIIGARSLDEGER
KYIKESGMKVYTMHEIDRLGMTKVIEETLDYLSACDGVHLSLDLDGLDPNDAPGVGTPVV
GGISYRESHLAMEMLYDAGIITSAEFVEVNPILDHKNKTGKTAVELVESLLGKKLL (配列番号36)

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約４１４０７３８から４１４１６２５ｂｐで見られる。

【０１９１】

Ｂ．ズブチリス１６８のＴｄｈタンパク質（トレオニン－３－デヒドロゲナーゼ）のＴｄｈコード配列を以下に示す：

【式３９】

【０１９２】

ATGCAGAGTGGAAAGATGAAAGCTCTAATGAAAAAGGACGGGGCGTTCGGTGCTGT
GCTGACTGAAGTTCCCATTCCTGAGATTGATAAACATGAAGTCCTCATAAAAGTGAAA
GCCGCTTCCATATGCGGCACGGATGTCCACATTTATAATTGGGATCAATGGGCACGT
CAGAGAATCAAAACACCCTATGTTTTCGGCCATGAGTTCAGCGGCATCGTAGAGGGC
GTGGGAGAGAATGTCAGCAGTGTAAAAGTGGGAGAGTATGTGTCTGCGGAAACACA
CATTGTCTGTGGTGAATGTGTCCCTTGCCTAACAGGAAAATCTCATGTGTGTACCAAT
ACTGCTATAATCGGAGTGGACACGGCAGGCTGTTTTGCGGAGTATGTAAAAGTTCCA
GCTGATAACATTTGGAGAAATCCCGCTGATATGGACCCGTCGATTGCTTCCATTCAAG
AGCCTTTAGGAAATGCAGTTCATACCGTACTCGAGAGCCAGCCTGCAGGAGGAACGA
CTGCAGTCATTGGATGCGGACCGATTGGTCTTATGGCTGTTGCGGTTGCAAAAGCAG
CAGGAGCTTCTCAGGTGATAGCGATTGATAAGAATGAATACAGGCTGAGGCTTGCAA
AACAAATGGGAGCGACTTGTACTGTTTCTATTGAAAAAGAAGACCCGCTCAAAATTGT
AAGCGCTTTAACGAGTGGAGAAGGAGCAGATCTTGTTTGTGAGATGTCGGGCCATCC
CTCAGCGATTGCCCAAGGTCTTGCGATGGCTGCGAATGGCGGAAGATTTCATATTCT
CAGCTTGCCGGAACATCCGGTGACAATTGATTTGACGAATAAAGTGGTATTTAAAGG
GCTTACCATCCAAGGAATCACAGGAAGAAAAATGTTTTCAACATGGCGCCAGGTGTC
TCAGTTGATCAGTTCAAACATGATCGATCTTGCACCTGTTATTACCCATCAGTTTCCAT
TAGAGGAGTTTGAAAAAGGTTTCGAACTGATGAGAAGCGGGCAGTGCGGAAAAGTAA
TTTTAATTCCA (配列番号37)

Ｔｄｈタンパク質の推定アミノ酸配列は：
【式４０】
【０１９３】

MQSGKMKALMKKDGAFGAVLTEVPIPEIDKHEVLIKVKAASICGTDVHIYNWDQWARQRI
KTPYVFGHEFSGIVEGVGENVSSVKVGEYVSAETHIVCGECVPCLTGKSHVCTNTAIIGV
DTAGCFAEYVKVPADNIWRNPADMDPSIASIQEPLGNAVHTVLESQPAGGTTAVIGCGPI
GLMAVAVAKAAGASQVIAIDKNEYRLRLAKQMGATCTVSIEKEDPLKIVSALTSGEGADLV
CEMSGHPSAIAQGLAMAANGGRFHILSLPEHPVTIDLTNKVVFKGLTIQGITGRKMFSTW
RQVSQLISSNMIDLAPVITHQFPLEEFEKGFELMRSGQCGKVILIP (配列番号 38)

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約１７６９７３１から１７７０７７１ｂｐで見られる。
【０１９４】
トリプトファンオペロン調節領域のコード配列及び遺伝子ｔｒｐＥ（配列番号４８）、ｔｒｐＤ（配列番号４６）、ｔｒｐＣ（配列番号４４）、ｔｒｐＦ（配列番号５０）、ｔｒｐＢ（配列番号４２）及びｔｒｐＡ（配列番号４０）は以下に示す。下線部はオペロン調節領域である。太字はｔｒｐＥ開始（ＡＴＧ）であり、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＦ、ｔｒｐＢ及びｔｒｐＡ開始が同様に続く（示した順番に太字で表す）。
【式４１】
【０１９５】

TAATACGATAAGAACAGCTTAGAAATACACAAGAGTGTGTATAAAGCAATTAGAATGA
GTTGAGTTAGAGAATAGGGTAGCAGAGAATGAGTTTAGTTGAGCTGAGACATTATGTT
TATTCTACCCAAAAGAAGTCTTTCTTTTGGGTTTATTTGTTATATAGTATTTTATCCTCT
CATGCCATCTTCTCATTCTCCTTGCCATAAGGAGTGAGAGCAATGAATTTCCAATCAA
ACATTTCCGCATTTTTAGAGGACAGCTTGTCCCACCACACGATACCGATTGTGGAGAC
CTTCACAGTCGATACACTGACACCCATTCAAATGATAGAGAAGCTTGACAGGGAGATT
ACGTATCTTCTTGAAAGCAAGGACGATACATCCACTTGGTCCAGATATTCGTTTATCG
GCCTGAATCCATTTCTCACAATTAAAGAAGAGCAGGGCCGTTTTTCGGCCGCTGATC
AGGACAGCAAATCTCTTTACACAGGAAATGAACTAAAAGAAGTGCTGAACTGGATGAA
TACCACATACAAAATCAAAACACCTGAGCTTGGCATTCCTTTTGTCGGCGGAGCTGTC
GGGTACTTAAGCTATGATATGATCCCGCTGATTGAGCCTTCTGTTCCTTCGCATACCA
AAGAAACAGACATGGAAAAGTGTATGCTGTTTGTTTGCCGGACATTAATTGCGTATGA
TCATGAAACCAAAAACGTCCACTTTATCCAATATGCAAGGCTCACTGGAGAGGAAACA
AAAAACGAAAAAATGGATGTATTCCATCAAAATCATCTGGAGCTTCAAAATCTCATTGA
AAAAATGATGGACCAAAAAAACATAAAAGAGCTGTTTCTTTCTGCTGATTCATACAAGA
CACCCAGCTTTGAGACAGTATCTTCTAATTATGAAAAATCGGCTTTTATGGCTGATGTA
GAAAAAATCAAAAGCTATATAAAAGCAGGCGATATCTTCCAGGGTGTTTTATCACAAA
AATTTGAGGTGCCGATAAAAGCAGATGCTTTTGAGTTATACCGAGTGCTTAGGATCGT
CAATCCTTCGCCGTATATGTATTATATGAAACTGCTAGACAGAGAAATAGTCGGCAGC
TCTCCGGAACGGTTAATACACGTTCAAGACGGGCACTTAGAAATCCATCCGATTGCC
GGTACGAGAAAACGCGGTGCAGACAAAGCTGAAGATGAGAGACTGAAGGTTGAGCT
CATGAAGGATGAAAAAGAAAAAGCGGAGCATTACATGCTCGTTGATCTTGCCCGAAA
CGATATCGGCAGAGTAGCAGAGTATGGTTCTGTTTCTGTGCCGGAGTTCACAAAAAT
TGTTTCCTTTTCACATGTCATGCACATTATCTCGGTGGTTACAGGCCGATTGAAAAAA
GGGGTTCATCCTGTCGATGCACTGATGTCTGCTTTCCCGGCGGGGACTTTAACAGGC
GCACCCAAAATCCGTGCCATGCAGCTTTTGCAAGAACTCGAGCCAACACCGAGAGAG
ACATACGGAGGGTGTATTGCCTACATTGGGTTTGACGGAATATCGACTCTTGTATTA
CGATTCGCACGATGAGTGTAAAGAACGGTGTTGCATCGATACAGGCAGGTGCTGGC
ATTGTTGCTGATTCTGTTCCGGAAGCCGAATACGAAGAAAGCTGTAATAAAGCCGGT
GCGCTGCTGAAAACGATTCATATTGCAGAAGACATGTTTCATAGCAAGGAGGATAAA
GCTGATGAACAGATTTCTACAATTGTGCGTTGACGGAAAAACCCTTACTGCCGGTGA
GGCTGAAACGCTGATGAATATGATGATGGCAGCGGAAATGACTCCTTCTGAAATGGG
GGGGATATTGTCAATTCTTGCTCATCGGGGGGAGACGCCAGAAGAGCTTGCGGGTT
TTGTGAAGGCAATGCGGGCACACGCTCTTACAGTCGATGGACTTCCTGATATTGTTG
ATACATGCGGAACAGGGGGAGACGGTATTTCCACTTTTAATATCTCAACGGCCTCGG
CAATTGTTGCCTCGGCAGCTGGTGCGAAAATCGCTAAGCATGGCAATCGCTCTGTCT
CTTCTAAAAGCGGAAGCGCTGATGTTTTAGAGGAGCTAGAGGTTTCTATTCAAACCAC
TCCCGAAAAGGTCAAAAGCAGCATTGAAACAAACAACATGGGATTTCTTTTTGCGCCG
CTTTACCATTCGTCTATGAAACATGTAGCAGGTACTAGAAAAGAGCTAGGTTTCAGAA
CGGTATTTAATCTGCTTGGGCCGCTCAGCAATCCTTTACAGGCGAAGCGTCAGGTGA
TTGGGGTCTATTCTGTTGAAAAAGCTGGACTGATGGCAAGCGCACTGGAGACGTTTC
AGCCGAAGCACGTTATGTTTGTATCAAGCCGTGACGGTTTAGATGAGCTTTCAATTAC
AGCACCGACCGACGTGATTGAATTAAAGGACGGAGAGCGCCGGGAGTATACCGTTT
CACCCGAAGATTTCGGTTTCACAAATGGCAGACTTGAAGATTTACAGGTGCAGTCTCC
GAAAGAGAGCGCTTATCTCATTCAGAATATTTTTGAAAATAAAAGCAGCAGTTCCGCT
TTATCTATTACGGCTTTTAATGCGGGTGCTGCGATTTACACGGCGGGAATTACCGCCT
CACTGAAGGAAGGAACGGAGCTGGCGTTAGAGACGATTACAAGCGGAGGCGCTGCC
GCGCAGCTTGAACGACTAAAGCAGAAAGAGGAAGAGATCTATGCTTGAAAAAATCAT
CAAACAAAAGAAAGAAGAAGTGAAAACACTGGTTCTGCCGGTAGAGCAGCCTTTCGA
GAAACGTTCATTTAAGGAGGCGCCGGCAAGCCCGAATCGGTTTATCGGGTTGATTGC
CGAAGTGAAGAAAGCATCGCCGTCAAAAGGGCTTATTAAAGAGGATTTTGTACCTGT
GCAGATTGCAAAAGACTATGAGGCTGCGAAGGCAGATGCGATTTCCGTTTTAACAGA
CACCCCGTTTTTTCAAGGGGAAAACAGCTATTTATCAGACGTAAAGCGTGCTGTTTCG
ATTCCTGTACTTAGAAAAGATTTTATTATTGATTCTCTTCAAGTAGAGGAATCAAGAAG
AATCGGAGCGGATGCCATATTGTTAATCGGCGAGGTGCTTGATCCCTTACACCTTCAT
GAATTATATCTTGAAGCAGGTGAAAAGGGGATGGACGTGTTAGTGGAGGTTCATGAT
GCATCAACGCTAGAACAAATATTGAAAGTGTTCACACCCGACATTCTCGGCGTAAATA

ATCGAAACCTAAAAACGTTTGAAACATCTGTAAAGCAGACAGAACAAATCGCATCTCT
CGTTCCGAAAGAATCCTTGCTTGTCAGCGAAAGCGGAATCGGTTCTTTAGAACATTTA
ACATTTGTCAATGAACATGGGGCGCGAGCTGTACTTATCGGTGAATCATTGATGAGA
CAAACTTCTCAGCGTAAAGCAATCCATGCTTTGTTTAGGGAGTGAGGTTGTGAAGAAA
CCGGCATTAAAATATTGCGGTATTCGGTCACTAAAGGATTTGCAGCTTGCGGCGGAA
TCACAGGCTGATTACCTAGGATTTATTTTTGCTGAAAGCAAACGAAAAGTATCTCCGG
AAGATGTGAAAAAATGGCTGAACCAAGTTCGTGTCGAAAAACAGGTTGCAGGTGTTTT
TGTTAATGAATCAATAGAGACGATGTCACGTATTGCCAAGAGCTTGAAGCTCGACGTC
ATTCAGCTTCACGGTGATGAAAAACCGGCGGATGTCGCTGCTCTTCGCAAGCTGACA
GGCTGTGAAATATGGAAGGCGCTTCACCATCAAGATAACACAACTCAAGAAATAGCC
CGCTTTAAAGATAATGTTGACGGCTTTGTGATTGATTCATCTGTAAAAGGGTCTAGAG
GCGGAACTGGTGTTGCATTTTCTTGGGACTGTGTGCCGGAATATCAGCAGGCGGCTA
TTGGTAAACGCTGCTTTATCGCTGGCGGCGTGAATCCGGATAGCATCACACGCCTAT
TGAAATGGCAGCCAGAAGGAATTGACCTTGCCAGCGGAATTGAAAAAAACGGACAAA
AAGATCAGAATCTGATGAGGCTTTTAGAAGAAAGGATGAACCGATATGTATCCATATC
CGAATGAAATAGGCAGATACGGTGATTTTGGCGGAAAGTTTGTTCCGGAAACACTCA
TGCAGCCGTTAGATGAAATACAAACAGCATTTAAACAAATCAAGGATGATCCCGCTTT
TCGTGAAGAGTATTATAAGCTGTTAAAGGACTATTCCGGACGCCCGACTGCATTAACA
TACGCTGATCGAGTCACTGAATACTTAGGCGGCGCGAAAATCTATTTGAAACGAGAA
GATTTAAACCATACAGGTTCTCATAAAATCAATAATGCGCTAGGTCAAGCGCTGCTTG
CTAAAAAAATGGGCAAAACGAAAATCATTGCTGAAACCGGTGCCGGCCAGCATGGTG
TTGCCGCTGCAACAGTTGCAGCCAAATTCGGCTTTTCCTGTACTGTGTTTATGGGTGA
AGAGGATGTTGCCCGCCAGTCTCTGAACGTTTTCCGCATGAAGCTTCTTGGAGCGGA
GGTAGTGCCTGTAACAAGCGGAAACGGAACATTGAAGGATGCCACAAATGAGGCGA
TCCGGTACTGGGT
TCAGCATTGTGAGGATCACTTTTATATGATTGGATCAGTTGTCGGCCCGCATCCTTAT
CCGCAAGTGGTCCGTGAATTTCAAAAAATGATCGGAGAGGAAGCGAAGGATCAGTTG
AAACGTATTGAAGGCACTATGCCTGATAAAGTAGTGGCATGTGTAGGCGGAGGAAGC
AATGCGATGGGTATGTTTCAGGCATTTTTAAATGAAGATGTTGAACTGATCGGCGCTG
AAGCAGCAGGAAAAGGAATTGATACACCTCTTCATGCCGCCACTATTTCGAAAGGAA
CCGTAGGGGTTATTCACGGTTCATTGACTTATCTCATTCAGGATGAGTTCGGGCAAAT
TATTGAGCCCTACTCTATTTCAGCCGGTCTCGACTATCCTGGAATCGGTCCGGAGCA
TGCATATTTGCATAAAAGCGGCCGTGTCACTTATGACAGTATAACCGATGAAGAAGC
GGTGGATGCATTAAAGCTTTTGTCAGAAAAAGAGGGGATTTTGCCGGCAATCGAATC
TGCCCATGCGTTAGCGAAAGCATTCAAACTCGCCAAAGGAATGGATCGCGGTCAACT
CATTCTCGTCTGTTTATCAGGCCGGGGAGACAAGGATGTCAACACATTAATGAATGTA
TTGGAAGAAGAGGTGAAAGCCCATGTTTAAATTGGATCTTCAACCATCAGAAAAATTG
TTTATCCCGTTTATTACGGCGGGCGATCCAGTTCCTGAGGTTTCGATTGAACTGGCG
AAGTCACTCCAAAAAGCAGGCGCCACAGCATTGGAGCTTGGTGTTGCATACTCTGAC
CCGCTTGCAGACGGTCCGGTGATCCAGCGGGCTTCAAAGCGGGCGCTTGATCAAGG
AATGAATATCGTAAAGGCAATCGAATTAGGCGGAGAAATGAAAAAAAACGGAGTGAA
TATTCCGATTATCCTCTTTACGTATTATAATCCTGTGTTACAATTGAACAAAGAATACTT
TTTCGCTTTACTGCGGGAAAATCATATTGACGGTCTGCTTGTTCCGGATCTGCCATTA
GAAGAAAGCAACAGCCTTCAAGAGGAATGTAAAAGCCATGAGGTGACGTATATTTCTT
TAGTTGCGCCGACAAGCGAAAGCCGTTTGAAAACCATTATTGAACAAGCCGAGGGGT
TCGTCTACTGTGTATCTTCTCTGGGTGTGACCGGTGTCCGCAATGAGTTCAATTCATC
CGTGTACCCGTTCATTCGTACTGTGAAGAATCTCAGCACTGTTCCGGTTGCTGTAGG
GTTCGGTATATCAAACCGTGAACAGGTCATAAAGATGAATGAAATTAGTGACGGTGTC
GTAGTGGGAAGTGCGCTCGTCAGAAAAATAGAAGAATTAAAGGACCGGCTCATCAGC
GCTGAAACGAGAAATCAGGCGCTGCAGGAGTTTGAGGATTATGCAATGGCGTTTAGC
GGCTTGTACAGTTTAAAA (配列番号39)

推定ＴｒｐＡタンパク質（トリプトファンシンターゼ（αサブユニット））の配列は：
【式４２】
【０１９６】

MFKLDLQPSEKLFIPFITAGDPVPEVSIELAKSLQKAGATALELGVAYSDPLADGPVIQR
ASKRALDQGMNIVKAIELGGEMKKNGVNIPIILFTYYNPVLQLNKEYFFALLRENHIDGL
LVPDLPLEESNSLQEECKSHEVTYISLVAPTSESRLKTIIEQAEGFVYCVSSLGVTGVRN
EFNSSVYPFIRTVKNLSTVPVAVGFGISNREQVIKMNEISDGVVVGSALVRKIEELKDRL
ISAETRNQALQEFEDYAMAFSGLYSLK (配列番号41)

推定ＴｒｐＢタンパク質（トリプトファンシンターゼ（βサブユニット））の配列は：
【式４３】
【０１９７】

MYPYPNEIGRYGDFGGKFVPETLMQPLDEIQTAFKQIKDDPAFREEYYKLLKDYSGRPTA
LTYADRVTEYLGGAKIYLKREDLNHTGSHKINNALGQALLAKKMGKTKIIAETGAGQHGVA
AATVAAKFGFSCTVFMGEEDVARQSLNVFRMKLLGAEVVPVTSGNGTLKDATNEAIRYW
VQHCEDHFYMIGSVVGPHPYPQVVREFQKMIGEEAKDQLKRIEGTMPDKVVACVGGGS
NAMGMFQAFLNEDVELIGAEAAGKGIDTPLHAATISKGTVGVIHGSLTYLIQDEFGQIIEPY
SISAGLDYPGIGPEHAYLHKSGRVTYDSITDEEAVDALKLLSEKEGILPAIESAHALAKAFKL
AKGMDRGQLILVCLSGRGDKDVNTLMNVLEEEVKAHV (配列番号43)

推定ＴｒｐＣタンパク質（インドール－３－グリセロールリン酸シンターゼ）の配列は：
【式４４】
【０１９８】

MLEKIIKQKKEEVKTLVLPVEQPFEKRSFKEAPASPNRFIGLIAEVKKASPSKGLIKEDF
VPVQIAKDYEAAKADAISVLTDTPFFQGENSYLSDVKRAVSIPVLRKDFIIDSLQVEESR
RIGADAILLIGEVLDPLHLHELYLEAGEKGMDVLVEVHDASTLEQILKVFTPDILGVNNR
NLKTFETSVKQTEQIASLVPKESLLVSESGIGSLEHLTFVNEHGARAVLIGESLMRQTSQ
RKAIHALFRE (配列番号45)

推定ＴｒｐＤタンパク質（アントラニル酸ホスフォリボシルトランスフェラーゼ）の配列は：
【式４５】
【０１９９】

MNRFLQLCVDGKTLTAGEAETLMNMMMAAEMTPSEMGGILSILAHRGETPEELAGFVKA
MRAHALTVDGLPDIVDTCGTGGDGISTFNISTASAIVASAAGAKIAKHGNRSVSSKSGSAD
VLEELEVSIQTTPEKVKSSIETNNMGFLFAPLYHSSMKHVAGTRKELGFRTVFNLLGPLSN
PLQAKRQVIGVYSVEKAGLMASALETFQPKHVMFVSSRDGLDELSITAPTDVIELKDGER
REYTVSPEDFGFTNGRLEDLQVQSPKESAYLIQNIFENKSSSSALSITAFNAGAAIYTAGIT
ASLKEGTELALETITSGGAAAQLERLKQKEEEIYA (配列番号47)

推定ＴｒｐＥタンパク質（アントラニル酸シンターゼ）の配列は：
【式４６】
【０２００】

MNFQSNISAFLEDSLSHHTIPIVETFTVDTLTPIQMIEKLDREITYLLESKDDTSTWSRY
SFIGLNPFLTIKEEQGRFSAADQDSKSLYTGNELKEVLNWMNTTYKIKTPELGIPFVGGA
VGYLSYDMIPLIEPSVPSHTKETDMEKCMLFVCRTLIAYDHETKNVHFIQYARLTGEETK
NEKMDVFHQNHLELQNLIEKMMDQKNIKELFLSADSYKTPSFETVSSNYEKSAFMADVEK
IKSYIKAGDIFQGVLSQKFEVPIKADAFELYRVLRIVNPSPYMYYMKLLDREIVGSSPERLIH
VQDGHLEIHPIAGTRKRGADKAEDERLKVELMKDEKEKAEHYMLVDLARNDIGRVAEYG
SVSVPEFTKIVSFSHVMHIISVVTGRLKKGVHPVDALMSAFPAGTLTGAPKIRAMQLLQEL
EPTPRETYGGCIAYIGFDGNIDSCITIRTMSVKNGVASIQAGAGIVADSVPEAEYEESCNKA
GALLKTIHIAEDMFHSKEDKADEQISTIVR（配列番号49）

推定ＴｒｐＦタンパク質（ホスフォリボシルアントラニル酸イソメラーゼ）の配列は：
【式４７】
【０２０１】

MKKPALKYCGIRSLKDLQLAAESQADYLGFIFAESKRKVSPEDVKKWLNQVRVEKQVAG
VFVNESIETMSRIAKSLKLDVIQLHGDEKPADVAALRKLTGCEIWKALHHQDNTTQEIARF
KDNVDGFVIDSSVKGSRGGTGVAFSWDCVPEYQQAAIGKRCFIAGGVNPDSITRLLKWQ
PEGIDLASGIEKNGQKDQNLMRLLEERMNRYVSISE（配列番号51）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約２３７０７０７から２３７６８３４ｂｐ（最初のｂｐ＝２３７６８３４；最後のｂｐ＝２３７０７０７）で見られる。
【０２０２】
Ｂ．ズブチリス１６８のｙｃｇＭタンパク質（プロリンオキシダーゼに類似）のｙｃｇＭコード配列を以下に示す：
【式４８】
【０２０３】

GTGATCACAAGAGATTTTTTCTTATTTTTATCCAAAAGCGGCTTTCTCAATAAAATGGC
GAGGAACTGGGGAAGTCGGGTAGCAGCGGGTAAAATTATCGGCGGGAATGACTTTA
ACAGTTCAATCCCGACCATTCGACAGCTTAACAGCCAAGGCTTGTCAGTTACTGTCGA
TCATTTAGGCGAGTTTGTGAACAGCGCCGAGGTCGCACGGGAGCGTACGGAAGAGT
GCATTCAAACCATTGCGACCATCGCGGATCAGGAGCTGAACTCACACGTTTCTTTAAA
AATGACGTCTTTAGGTTTGGATATAGATATGGATTTGGTGTATGAAAATATGACAAAAA
TCCTTCAGACGGCCGAGAAACATAAAATCATGGTCACCATTGACATGGAGGACGAAG
TCAGATGCCAGAAAACGCTTGATATTTTCAAAGATTTCAGAAAGAAATACGAGCATGT
GAGCACAGTGCTGCAAGCCTATCTGTACCGGACGGAAAAAGACATTGACGATTTGGA
TTCTTTAAACCCGTTCCTTCGCCTTGTAAAAGGAGCTTATAAAGAATCAGAAAAAGTA
GCTTTCCCGGAGAAAAGCGATGTCGATGAAAATTACAAAAAAATCATCCGAAAGCAG
CTCTTAAACGGTCACTATACAGCGATTGCCACACATGACGACAAAATGATCGACTTTA
CAAAGCAGCTTGCCAAGGAACATGGCATTGCCAATGACAAGTTTGAATTTCAGATGCT
GTACGGCATGCGGTCGCAAACCCAGCTCAGCCTCGTAAAAGAAGGTTATAACATGAG
AGTCTACCTGCCATACGGCGAGGATTGGTACGGCTACTTTATGAGACGCCTTGCAGA
ACGTCCGTCAAACATTGCATTTGCTTTCAAAGGAATGACAAAGAAG（配列番号52）

ｙｃｇＭタンパク質の推定アミノ酸配列は：
【式４９】
【０２０４】

MITRDFFLFLSKSGFLNKMARNWGSRVAAGKIIGGNDFNSSIPTIRQLNSQGLSVTVDHL
GEFVNSAEVARERTEECIQTIATIADQELNSHVSLKMTSLGLDIDMDLVYENMTKILQTA
EKHKIMVTIDMEDEVRCQKTLDIFKDFRKKYEHVSTVLQAYLYRTEKDIDDLDSLNPFLR
LVKGAYKESEKVAFPEKSDVDENYKKIIRKQLLNGHYTAIATHDDKMIDFTKQLAKEHGI
ANDKFEFQMLYGMRSQTQLSLVKEGYNMRVYLPYGEDWYGYFMRRLAERPSNIAFAFK
GMTKK（配列番号53）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約３４４１１１から３４５０１９ｂｐで見られる。

【０２０５】

Ｂ．ズブチリス１６８のｙｃｇＮタンパク質（１－ピロリン－５－カルボン酸デヒドロゲナーゼに類似）のｙｃｇＮコード配列を以下に示す：

【式５０】

【０２０６】

ATGACAACACCTTACAAACACGAGCCATTCACAAATTTCCAAGATCAAAACTACGTGG
AAGCGTTTAAAAAAGCGCTTGCGACAGTAAGCGAATATTTAGGAAAAGACTATCCGCT
TGTCATTAACGGCGAGAGAGTGGAAACGGAAGCGAAAATCGTTTCAATCAACCCAGC
TGATAAAGAAGAAGTCGTCGGCCGAGTGTCAAAAGCGTCTCAAGAGCACGCTGAGC
AAGCGATTCAAGCGGCTGCAAAAGCATTTGAAGAGTGGAGATACACGTCTCCTGAAG
AGAGAGCGGCTGTCCTGTTCCGCGCTGCTGCCAAAGTCCGCAGAAGAAAACATGAA
TTCTCAGCTTTGCTTGTGAAAGAAGCAGGAAAGCCTTGGAACGAGGCGGATGCCGAT
ACGGCTGAAGCGATTGACTTCATGGAGTATTATGCACGCCAAATGATCGAACTGGCA
AAAGGCAAACCGGTCAACAGCCGTGAAGGCGAGAAAAACCAATATGTATACACGCCG
ACTGGAGTGACAGTCGTTATCCCGCCTTGGAACTTCTTGTTTGCGATCATGGCAGGC
ACAACAGTGGCGCCGATCGTTACTGGAAACACAGTGGTTCTGAAACCTGCGAGTGCT
ACACCTGTTATTGCAGCAAAATTTGTTGAGGTGCTTGAAGAGTCCGGATTGCCAAAAG
GCGTAGTCAACTTTGTTCCGGGAAGCGGATCGGAAGTAGGCGACTATCTTGTTGACC
ATCCGAAAACAAGCCTTATCACATTTACGGGATCAAGAGAAGTTGGTACGAGAATTTT
CGAACGCGCGGCGAAGGTTCAGCCGGGCCAGCAGCATTTAAAGCGTGTCATCGCTG
AAATGGGCGGTAAAGATACGGTTGTTGTTGATGAGGATGCGGACATTGAATTAGCGG
CTCAATCGATCTTTACTTCAGCATTCGGCTTTGCGGGACAAAAATGCTCTGCAGGTTC
ACGTGCAGTAGTTCATGAAAAAGTGTATGATCAAGTATTAGAGCGTGTCATTGAAATT
ACGGAATCAAAAGTAACAGCTAAACCTGACAGTGCAGATGTTTATATGGGACCTGTCA
TTGACCAAGGTTCTTATGATAAAATTATGAGCTATATTGAGATCGGAAAACAGGAAGG
GCGTTTAGTAAGCGGCGGTACTGGTGATGATTCGAAAGGATACTTCATCAAACCGAC
GATCTTCGCTGACCTTGATCCGAAAGCAAGACTCATGCAGGAAGAAATTTTCGGACC
TGTCGTTGCATTTTGTAAAGTGTCAGACTTTGATGAAGCTTTAGAAGTGGCAAACAAT
ACTGAATATGGTTTGACAGGCGCGGTTATCACAAACAACCGCAAGCACATCGAGCGT
GCGAAACAGGAATTCCATGTCGGAAACCTATACTTCAACCGCAACTGTACAGGTGCT
ATCGTCGGCTACCATCCGTTTGGCGGCTTCAAAATGTCGGGAACGGATTCAAAAGCA
GGCGGGCCGGATTACTTGGCTCTGCATATGCAAGCAAAAACAATCAGTGAAATGTTC
（配列番号54）

ｙｃｇＮタンパク質の推定アミノ酸配列は：

【式５１】

【０２０７】

MTTPYKHEPFTNFQDQNYVEAFKKALATVSEYLGKDYPLVINGERVETEAKIVSINPADK
EEVVGRVSKASQEHAEQAIQAAAKAFEEWRYTSPEERAAVLFRAAAKVRRRKHEFSALL
VKEAGKPWNEADADTAEAIDFMEYYARQMIELAKGKPVNSREGEKNQYVYTPTGVTVVI
PPWNFLFAIMAGTTVAPIVTGNTVVLKPASATPVIAAKFVEVLEESGLPKGVVNFVPGSGS
EVGDYLVDHPKTSLITFTGSREVGTRIFERAAKVQPGQQHLKRVIAEMGGKDTVVVDEDA
DIELAAQSIFTSAFGFAGQKCSAGSRAVVHEKVYDQVLERVIEITESKVTAKPDSADVYMG
PVIDQGSYDKIMSYIEIGKQEGRLVSGGTGDDSKGYFIKPTIFADLDPKARLMQEEIFGPVV
AFCKVSDFDEALEVANNTEYGLTGAVITNNRKHIERAKQEFHVGNLYFNRNCTGAIVGYH
PFGGFKMSGTDSKAGGPDYLALHMQAKTISEMF（配列番号55）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約３４５０３９から３４６５８３ｂｐで見られる。

【０２０８】

Ｂ．ズブチリス１６８のｓｉｇＤタンパク質（ＲＮＡポリメラーゼ鞭毛、運動、走化性及び自己分解シグマ因子）のｓｉｇＤコード配列を以下に示す：

【式５２】

【０２０９】

ATGCAATCCTTGAATTATGAAGATCAGGTGCTTTGGACGCGCTGGAAAGAGTGGAAA
GATCCTAAAGCCGGTGACGACTTAATGCGCCGTTACATGCCGCTTGTCACATATCAT
GTAGGCAGAATTTCTGTCGGACTGCCGAAATCAGTGCATAAAGACGATCTTATGAGC
CTTGGTATGCTTGGTTTATATGATGCCCTTGAAAAATTTGACCCCAGCCGGGACTTAA
AATTTGATACCTACGCCTCGTTTAGAATTCGCGGCGCAATCATAGACGGGCTTCGTAA
AGAAGATTGGCTGCCCAGAACCTCGCGCGAAAAAACAAAAAAGGTTGAAGCAGCAAT
TGAAAAGCTTGAACAGCGGTATCTTCGGAATGTATCGCCCGCGGAAATTGCAGAGGA
ACTCGGAATGACGGTACAGGATGTCGTGTCAACAATGAATGAAGGTTTTTTTGCAAAT
CTGCTGTCAATTGATGAAAAGCTCCATGATCAAGATGACGGGGAAAACATTCAAGTCA
TGATCAGAGATGACAAAAATGTTCCGCCTGAAGAAAAGATTATGAAGGATGAACTGAT
TGCACAGCTTGCGGAAAAAATTCACGAACTCTCTGAAAAAGAACAGCTGGTTGTCAG
TTTGTTCTACAAAGAGGAGTTGACACTGACAGAAATCGGACAAGTATTAAATCTTTCT
ACGTCCCGCATATCTCAGATCCATTCAAAGGCATTATTTAAATTAAAGAATCTGCTGG
AAAAAGTGATACAA（配列番号56）

ｓｉｇＤの推定アミノ酸配列は：

【式５３】

【０２１０】

MQSLNYEDQVLWTRWKEWKDPKAGDDLMRRYMPLVTYHVGRISVGLPKSVHKDDLMS
LGMLGLYDALEKFDPSRDLKFDTYASFRIRGAIIDGLRKEDWLPRTSREKTKKVEAAIEKL
EQRYLRNVSPAEIAEELGMTVQDVVSTMNEGFFANLLSIDEKLHDQDDGENIQVMIRDDK
NVPPEEKIMKDELIAQLAEKIHELSEKEQLVVSLFYKEELTLTEIGQVLNLSTSRISQIHSKA
LFKLKNLLEKVIQ（配列番号57）

さらに、当該コード領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約１７１５７８６から１７１６５４７ｂｐで見られる。

【０２１１】

上述の通り、その他のバチルス宿主で見られる不活性化類似遺伝子は本発明で使用できると考えられる。

【０２１２】

いくつかの好ましい実施態様において、宿主細胞はバチルス属のメンバーであり、一方他の実施態様において、目的バチルス株は好アルカリ性である。多数の好アルカリ性バチ

ルス株が公知である（例えば、米国特許第５，２１７，８７８号及びＡｕｎｓｔｒｕｐ　ｅｔ　ａｌ．、Ｐｒｏｃ　ＩＶ　ＩＦＳ：Ｆｅｒｍｅｎｔ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ，２９９－３０５［１９７２］を参照）。いくつかの好ましい実施態様において、目的のバチルス株は工業バチルス株である。工業バチルス株の例としては、限定されないが、Ｂ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス及びＢ．アミロリケファシエンスが挙げられる。別の実施態様において、バチルス宿主株は、Ｂ．レンタス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．チューリンゲンシス、Ｂ．クラウジイ及びＢ．メガテリウム、並びに上述のバチルス属内のその他の微生物からなる群より選択される。いくつかの特に好ましい実施態様において、Ｂ．ズブチリスを用いる。例えば、米国特許第５，２６４，３６６号及び第４，７６０，０２５号（ＲＥ３４，６０６）は本発明で使用できる種々のバチルス宿主株について記載しているが、その他の適当な株も本発明に使用できると考えられる。

【０２１３】

工業株はバチルス種の非組換え体であってもよく、天然株の変異体または組換え体株であってもよい。好ましくは、宿主株は組換え宿主株であり、目的のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドが宿主内に導入されている。さらに好ましい宿主株はバチルス・ズブチリス宿主株であり、特に組換えバチルス・ズブチリス宿主株である。多数のＢ．ズブチリス株が公知であり、限定されないが、１Ａ６（ＡＴＣＣ３９０８５）、１６８（１Ａ０１）、ＳＢ１９、Ｗ２３、Ｔｓ８５、Ｂ６３７、ＰＢ１７５３～ＰＢ１７５８、ＰＢ３３６０、ＪＨ６４２、１Ａ２４３（ＡＴＣＣ３９，０８７）、ＡＴＣＣ２１３３２、ＡＴＣＣ６０５１、ＭＩ１１３、ＤＥ１００（ＡＴＣＣ３９，０９４）、ＧＸ４９３１、ＰＢＴ１１０、及びＰＥＰ２１１株（例えばＨｏｃｈ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，７３：２１５－２２８［１９７３］；米国特許第４，４５０，２３５号；米国特許第４，３０２，５４４及び欧州特許０１３４０４８号を参照）が挙げられる。発現宿主としてのＢ．ズブチリスの使用はさらにＰａｌｖａ　ｅｔ　ａｌ．などに記載されている（Ｐａｌｖａ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅ１９：８１－８７［１９８２］；Ｆａｈｎｅｓｔｏｃｋ　ａｎｄ　Ｆｉｓｃｈｅｒ、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１６５：７９６－８０４［１９８６］；及びＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　６９：３９－４７［１９８８］を参照）。

【０２１４】

工業プロテアーゼ生成バチルス株は特に好ましい発現宿主を提供する。いくつかの好ましい実施態様において、本発明でのこれらの株の使用はさらに効率及びプロテアーゼ生成を増大させる。通常バチルス種により２つの一般的な種類のプロテアーゼが分泌され、すなわち、中性（または“メタロプロテアーゼ”）及びアルカリ性（または“セリン”）プロテアーゼである。セリンプロテアーゼはペプチド結合の加水分解を触媒する酵素であり、活性部位に必須のセリン残基がある。セリンプロテアーゼは分子量が２５，０００～３０，０００である（Ｐｒｉｅｓｔ、Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．Ｒｅｖ．，４１：７１１－７５３［１９７７］を参照）。ズブチリシンは本発明での使用に好ましいセリンプロテアーゼである。多種多様のバチルス・ズブチリシンが同定及び配列決定されており、例えば、ズブチリシン１６８、ズブチリシンＢＰＮ’、ズブチリシン・カールスバーグ、ズブチリシンＤＹ、ズブチリシン１４７及びズブチリシン３０９である（例えば、欧州特許第４１４２７９号、ＷＯ８９／０６２７９号；及びＳｔａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１５９：８１１－８１８［１９８４］を参照）。本発明のいくつかの実施態様において、バチルス宿主株は変異（例えば変異体）プロテアーゼを生成する。多数の参考文献が変異体プロテアーゼの例及び参照を提供している（例えば、ＷＯ９９／２０７７０、ＷＯ９９／２０７２６、ＷＯ９９／２０７６９、ＷＯ８９／０６２７９、ＲＥ３４，６０６、米国特許第４，９１４，０３１号、米国特許第４，９８０，２８８号、米国特許第５，２０８，１５８号、米国特許第５，３１０，６７５号、米国特許第５，３３６，６１１号、米国特許第５，３９９，２８３号、米国特許第５，４４１，８８２号、米国特許第

５，４８２，８４９号、米国特許第５，６３１，２１７号、米国特許第５，６６５，５８７号、米国特許第５，７００，６７６号、米国特許第５，７４１，６９４号、米国特許第５，８５８，７５７号、米国特許第５，８８０，０８０号、米国特許第６，１９７，５６７号及び米国特許第６，２１８，１６５号を参照）。

【０２１５】

さらに他の実施態様において、好ましいバチルス宿主は、以下の遺伝子の少なくとも１つにおいて変異または欠失を有するバチルス種である：ｄｅｇＵ、ｄｅｇＳ、ｄｅｇＲ及びｄｅｇＱ。好ましくは、変異はｄｅｇＵ遺伝子にあり、より好ましくは変異はｄｅｇＵ（Ｈｙ）３２である。（Ｍｓａｄｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．、１７２：８２４－８３４［１９９０］；及びＯｌｍｏｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．，２５３：５６２－５６７［１９９７］参照）。最も好ましくは宿主株はｄｅｇＵ３２（Ｈｙ）変異を有するバチルス・ズブチリスである。さらなる実施態様において、バチルス宿主はｓｃｏＣ４（Ｃａｌｄｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８３：７３２９－７３４０［２００１］を参照）；ｓｐｏｌｌＥ（Ａｒｉｇｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，３１：１４０７－１４１５［１９９９］を参照）；ｏｐｐＡまたはその他のｏｐｐオペロンの遺伝子（Ｐｅｒｅｇｏ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｍｉｃｔｏｂｉｏｌ．，５：１７３－１８５［１９９１］を参照）における変異または欠失を含む。実際に、ｏｐｐＡ遺伝子における変異と同じ表現型を生じるｏｐｐオペロンにおける変異は本発明の変異バチルス株のいくつかの実施態様において使用できると考えられる。いくつかの実施態様において、これらの変異は単独で起こり、一方他の実施態様において、変異の組み合わせが存在する。いくつかの実施態様において、本発明の変異バチルスは上述の遺伝子の１以上の変異をすでに含むバチルス宿主株から得られる。別の実施態様において、本発明の変異バチルスは上述の遺伝子の１以上の変異を含むようにさらに設計される。

【０２１６】

さらに別の実施態様において、入来配列は２つのｌｏｘＰ部位間に位置する選択マーカーを含み（Ｋｕｈｎ　ａｎｄ　Ｔｏｒｒｅｓ、Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１８０：１７５－２０４［２００２］を参照）、抗菌剤はそれからＣｒｅタンパク質の活性により欠失される。いくつかの実施態様において、これは、相同フランキングＤＮＡ及び抗菌剤含有入来ＤＮＡを構築するために用いるプライマーにより測定される１のｌｏｘＰ部位の挿入及び天然ＤＮＡの欠失を生じる。

【０２１７】

当業者はバチルス細胞内にポリヌクレオチド配列を導入する適切な方法をよく知っている（例えば、Ｆｅｒｒａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．、“Ｇｅｎｅｔｉｃｓ”、Ｈａｒｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．（編集）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｒｐ．［１９８９］、５７～７２頁、また、Ｓａｕｎｄｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５７：７１８－７２６［１９８４］；Ｈｏｃｈ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．、９３：１９２５－１９３７［１９６７］；Ｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１３：１３１－１３５［１９８６］；及びＨｏｌｕｂｏｖａ、Ｆｏｌｉａ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，３０：９７［１９８５］；Ｂ．ズブチリス、Ｃｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．，１６８：１１－１１５［１９７９］；Ｂ．メガテリウム、Ｖｏｒｏｂｊｅｖａ　ｅｔ　ａｌ．、ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．，７：２６１－２６３［１９８０］；Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，５１：６３４（１９８６）；Ｂ．チューリンゲンシス、Ｆｉｓｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｒｃｈ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１３９：２１３－２１７「１９８１」；及びＢ．スファエリカス、ＭｃＤｏｎａｌｄ、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１３０：２０３［１９８４］を参照）。実際、プロトプラスト形質転換及び配向（ｃｏｎｇｒｅｓｓｉｏｎ）、形質導入及びプロプラスト融合などの形質転換の方法は公知であり、本発明での使用に適している。形質転換の方法は特に本発明により提供されるＤＮＡ構築体を宿主細胞に

導入するために好ましい。

【０２１８】

一般的に使用される方法に加えて、いくつかの実施態様において、宿主細胞は直接形質転換される（すなわち、媒介細胞を増幅のために使用しない、または別の方法では、ＤＮＡ構築体を宿主細胞内に前もって導入する）。宿主細胞内へのＤＮＡ構築体の導入は、プラスミドまたはベクター内への導入なしで、宿主細胞内に導入するための当業者に公知の物理的及び化学的方法を含む。当該方法は、限定されないが、塩化カルシウム沈殿法、エレクトロポレーション、裸のＤＮＡ（ｎａｋｅｄ　ＤＮＡ）、リポソーム等が挙げられる。別の実施態様において、ＤＮＡ構築体は、プラスミド内に導入されることなく、プラスミドを用いて共形質転換される。さらに別の実施態様において、選択マーカーは当業者に公知の方法により変異バチルス株から欠失される（Ｓｔａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１５８：４１１－４１８［１９８４］；及びＰａｌｍｅｒｏｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅ　２４７：２５５－２６４［２０００］を参照）。

【０２１９】

いくつかの実施態様において、宿主細胞は、本発明に従う１以上のＤＮＡ構築体を用いて形質転換され、２以上の遺伝子が宿主細胞中で不活性化されている変異バチルス株を生成する。いくつかの実施態様において、２以上の遺伝子は宿主細胞染色体から欠失される。別の実施態様において、2以上の遺伝子はＤＮＡ構築体の挿入により不活性化される。いくつかの実施態様において、不活性化遺伝子は連続しており（欠失及び／または挿入による不活性化に関わらず）、一方、他の実施態様において、連続した遺伝子ではない。

【０２２０】

細胞内及び細胞外で発現したポリペプチドの活性化を検出及び測定する当業者に公知の様々な分析法が存在する。特に、プロテアーゼに関しては、吸光度２８０ｎｍで測定、またはＦｏｌｉｎ法を用いた比色分析により測定したカゼインまたはヘモグロビンからの酸溶性ペプチドの放出に基づく分析法がある（例えば、Ｂｅｒｇｍｅｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、“Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ　Ａｎａｌｙｓｉｓ”ｖｏｌ．５、Ｐｅｐｔｉｄａｓｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎａｓｅｓ　ａｎｄ　ｔｈｅｉｒ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ（ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、及びそれらの阻害因子）、Ｖｅｒｌａｇ　Ｃｈｅｍｉｅ、Ｗｅｉｎｈｅｉｍ「１９８４」を参照）。その他の分析法は発色基質の可溶化を含む（例えば、Ｗａｒｄ、“Ｐｒｏｔｅｉｎａｓｅｓ（プロテイナーゼ）”、Ｆｏｇａｒｔｙ（編集）、Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｅｎｚｙｍｅｓ　ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（微生物酵素及びバイオテクノロジー）、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，ロンドン［１９８３］、２５１～３１７頁を参照）。その他の分析法の例としては、スクシニルーＡｌａ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｈｅ－ｐａｒａニトロアニリド分析（ＳＡＡＰＦｐＮＡ）及び２，４，６－トリニトロベンゼンスルフォン酸ナトリウム塩分析（ＴＮＢＳ分析）が挙げられる。当業者に公知の多数の別の文献は適切な方法を提供する（例えば、Ｗｅｌｌｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１１：７９１１－７９２５［１９８３］；Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２２３：１１９－１２９［１９９４］；及びＨｓｉａ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｎａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２４２：２２１－２２７［１９９９］を参照）。

【０２２１】

宿主細胞内の目的タンパク質の分泌レベルの測定方法及び発現タンパク質の検出方法はタンパク質に特異なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いる免疫学的分析法の使用を含む。例としては、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、蛍光免疫分析法（ＦＩＡ）、及び蛍光活性化細胞分類法（ＦＡＣＳ）を含む。しかしながら、その他の方法も当業者に公知であり、目的タンパク質の評価に使用できる（例えば、Ｈａｍｐｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（血清学的方法、研究室マニュアル），ＡＰＳ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓｔ．Ｐａｕｌ，ＭＮ［１９９０］；及びＭａｄｄｏｘ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１５８：１２１１［１９８３］を参照）。いくつかの好ましい実施態様にお

いて、目的タンパク質の分泌は、対応する非変異宿主よりも本発明を用いて得た変異株におけるほうが高い。当業界で公知の通り、本発明を用いて生成した変異バチルス細胞は発現及び細胞培養物からの目的ポリペプチドの回収に適した条件下で維持及び成長する（例えば、Ｈａｒｗｏｏｄ　ａｎｄ　Ｃｕｔｔｉｎｇ（編集）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルスの分子生物学的方法）、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ［１９９０］を参照）。

【０２２２】

Ｂ．大量の染色体欠失

上述の通り、１及び複数の遺伝子欠失に加えて、本発明は大量の染色体欠失も提供する。本発明のいくつかの好ましい実施態様において、固有染色体領域またはそれらの断片はバチルス宿主細胞から欠失され、変異バチルス株を生成する。いくつかの実施態様において、固有染色体領域はプロファージ領域、抗菌領域（例えば、抗生物質領域）、調節領域、複数連続シングル遺伝子領域及び／またはオペロン領域を含む。ここで言及する固有染色体領域を描写する座標はバチルス・ズブチリス株１６８染色体地図に従って特定される。数字は通常、存在する場合は、リボソーム結合部位の開始部位に関するものであり、またはコード領域の末端に関し、及び存在するであろうターミネーターは通常含まない。株１６８のバチルス・ズブチリスゲノムは公知であり（Ｋｕｎｓｔ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ　３９０：２４９－２５６［１９９７］；及びＨｅｎｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．、４４：５７－８２［１９８０］を参照）、及び1の４２１５ｋｂ染色体からなる。しかしながら、本発明は任意のバチルス株由来の類似配列も含む。特に好ましくは、その他のＢ．ズブチリス株、Ｂ．リケニフォルミス株及びＢ．アミロリケファシエンス株である。

【０２２３】

いくつかの実施態様において、固有染色体領域はプロファージ断片及びそれらの断片を含む。“プロファージ断片”は細菌性染色体内に挿入されたウイルス性ＤＮＡであり、ウイルス性ＤＮＡは通常の細菌性遺伝子と事実上区別できない。Ｂ．ズブチリスゲノムは多数のプロファージ断片からなり、これらの断片は感染性ではない（Ｓｅａｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｂｉｏｃｈｅｍ．，３：６０７－６１３［１９６４］；及びＳｔｉｃｋｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｖｉｔｒｏｌ．，２６：１４２－１４５［１９６５］）。バチルス・ズブチリスプロファージ領域のいずれを欠失してもよいが、以下の非限定的例に関して説明する。

【０２２４】

本発明の実施態様において欠失される１のプロファージ領域はシグマＫ介在“スキン”要素である。この領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約２６５２６００ｂｐ（ｓｐｏｌＶＣＡ）～２７００５７９ｂｐ（ｙｑａＢ）で見られる。本発明を用いて、染色体の２６５３５６２ｂｐ～２６９９６０４ｂｐに対応する、約４６ｋｂ断片を欠失した。この要素は、ＳＩＧＫ　ＯＲＦ内、遺伝子ｓｐｏｌＶＣＢ～ｓｐｏｌｌｌＣ間に位置する祖先から受け継いだ溶原性ファージの残余物であると考えられる。しかしながら、本発明は欠失領域に関するいかなる特定のメカニズムまたは作用形態に限定されるものではない。当該要素は推定リボソーム結合部位を含む５７のオープン読取りフレームを含むように示されている（Ｔａｋｅｍａｒｕ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１４１：３２３－３２７　［１９９５］を参照）。母細胞における胞子形成時に、スキン要素は削除されてｓｉｇＫ遺伝子の再構築を導く。

【０２２５】

欠失に適したその他の領域はプロファージ７領域である。この領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約２７０１２０８ｂｐ（ｙｒｋＳ）～２７４９５７２ｂｐ（ｙｒａＫ）で見られる。本発明を用いて、染色体の２７０１０８７ｂｐ～２７４９６４２ｂｐに対応する、約４８．５ｋｂ断片を欠失した。

【０２２６】

さらなる領域はスキン＋プロファージ７領域である。この領域はＢ．ズブチリス１６８

染色体の約２６５２１５１ｂｐ～２７４９６４２ｂｐ（ｙｒａＫ）で見られる。本発明を用いて、約９７．５ｋｂの断片を欠失した。この領域は介在ｓｐｏｌｌｌＣ遺伝子も含む。スキン／プロファージ７領域は、限定されないが、以下の遺伝子を含む：ｓｐｏｌＶＣＡ－ＤＮＡリコンビナーゼ、ｂｌｔ（多剤耐性）、ｃｙｐＡ（シトクロムＰ４５０様酵素）、ｃｚｃＤ（カチオン流出システム膜タンパク質）、及びｒａｐＥ（応答制御因子アスパラギン酸ホスファターゼ）。

【０２２７】

さらに別の領域はＰＢＳＸ領域である。この領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約１３１９８８４ｂｐ（ｗｋｄＡ）～１３４７４９１ｂｐ（ｘｌｙＡ）で見られる。本発明を用いて、染色体の１３１９６６３ｂｐ～１３４８６９１ｂｐに対応する、約２９ｋｂ断片を欠失した。通常の非導入状態において、このプロファージ要素は非感染性であり、殺菌性ではない（Ｗ２３及びＳ３１などの数種の敏感な株を除く）。マイトマイシンＣが導入可能であり、ＳＯＳ応答により活性化され、ファージ様粒子を放出する細胞溶解を生じる。ファージ粒子は細菌性染色体ＤＮＡを含み、敏感な細菌をＤＮＡを注入することなく殺すことができる（Ｃａｎｏｓｉ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．３９：８１－９０［１９７８］）。この領域は以下の遺伝子の非限定的リストを含む：ｘｔｍＡ－Ｂ；ｘｋｄＡ－Ｋ及びＭ－Ｘ、ｘｒｅ、ｘｔｒＡ、ｘｐｆ、ｘｅｐ、ｘｈｌＡ－Ｂ及びｘｌｙＡ。

【０２２８】

別の領域はＳＰβ領域である。この領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約２１５０８２４ｂｐ（ｙｏｄＵ）～２２８６２４６ｂｐ（ｙｐｑＰ）で見られる。本発明を用いて、染色体の２１５１８２７ｂｐ～２２８５２４６ｂｐに対応する、約１３３．５ｋｂ断片を欠失した。この要素は機能がまだ特性付けられていない溶原性プロファージである。しかしながら、この領域の遺伝子は推定上の胞子殻タンパク質（ｙｏｄＵ、ｓｓｐＣ、ｙｏｋＨ）、推定上のストレス応答性タンパク質（ｙｏｒＤ、ｙｐｐＱ、ｙｐｎＰ）及び胞子殻における遺伝子と相同性を有するその他の遺伝子及びｙｏｍオペロンのメンバーなどストレス応答性遺伝子を含む。その他の遺伝子は以下を含む領域である：ｙｏｔ；ｙｏｓ、ｙｏｑ、ｙｏｐ、ｙｏｎ、ｙｏｍ、ｙｏｚ、ｙｏｌ、ｙｏｋ、ｙｐｏ、及びｙｐｍ。

【０２２９】

別の領域はプロファージ１領域である。この領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約２０２０９８ｂｐ（ｙｂｂＵ）～２２００１５ｂｐ（ｙｂｄＥ）で見られる。本発明を用いて、染色体の２０２１１２ｂｐ～２２０１４１ｂｐに対応する、約１８．０ｋｂ断片を欠失した。この領域の遺伝子は、ＤＮＡアルキル化に適応反応を与えるＡｄａＡ／Ｂオペロン及びＮＡＤＨデヒドロゲナーゼ、サブユニット５をコードするｎｄｈＦを含む。

【０２３０】

別の領域はプロファージ２領域である。この領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約５２９０６９ｂｐ（ｙｂｃＬ）～５６９４９３ｂｐ（ｙｄｅＪ）で見られる。本発明を用いて、染色体の５２９０６７ｂｐ～５６９５７８ｂｐに対応する、約４０．５ｋｂ断片を欠失した。この領域の遺伝子はｒａｐｌ／ｐｈｒｌｗｐ（応答制御因子アスパラギン酸ホスファターゼ）、ｓａｃＶ（レバンスクラーゼの転写調節因子）及びｃｓｐＣを含む。

【０２３１】

別の領域はプロファージ３領域である。本発明を用いて、Ｂ．ズブチリス１６８染色体の６５２０００ｂｐ～６６４３００ｂｐに対応する、約５０．７ｋｂ断片を欠失した。

【０２３２】

さらに別の領域はプロファージ４領域である。この領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の約１２６３０１７（ｙｊｃＭ）～１３１３６２７ｂｐ（ｙｊｏＡ）で見られる。本発明を用いて、染色体の１２６２９８７ｂｐ～１３１３６９２ｂｐに対応する、約２．３ｋｂ断片を欠失した。

【０２３３】

別の領域はプロファージ５領域である。本発明を用いて、Ｂ．ズブチリス１６８染色体

の１８７９２００ｂｐ～１９０００００ｂｐに対応する、約２０．８ｋｂ断片を欠失した。

【０２３４】

別の領域はプロファージ６領域である。本発明を用いて、Ｂ．ズブチリス１６８染色体の２０４６０５０ｂｐ～２０７８０００ｂｐに対応する、約３１．９ｋｂ断片を欠失した。

【０２３５】

別の実施態様において、固有染色体領域は１以上のオペロン領域、複数隣接シングル遺伝子領域、及び／または抗菌領域を含む。いくつかの実施態様において、これらの領域は以下を含む：

１）ＰＰＳオペロン領域：

この領域はバチルス・ズブチリス１６８染色体の約１９５９４１０（ｐｐｓＥ）～１９９７１７８ｂｐ（ｐｐｓＡ）で見られる。本発明を用いて、染色体の１９６０４０９ｂｐ～１９９８０２６ｐに対応する、約３８．６ｋｂ断片を欠失した。このオペロン領域は抗菌合成に関係し、プリパスタチン・シンテターゼをエンコードする；

２）ＰＫＳオペロン領域：

この領域はバチルス・ズブチリス１６８染色体の約１７８１１１０（ｐｋｓＡ）～１８５７７１２ｂｐ（ｐｋｓＲ）で見られる。本発明を用いて、染色体の１７８１７９５ｂｐ～１８５７９８５ｐに対応する、約７６．２ｋｂ断片を欠失した。この領域はポリケチドシンテアーゼをエンコードし、抗菌合成に関係する（Ｓｃｏｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅ、１３０：６５－７１［１９９３］）；

３）ｙｖｆＦ－ｙｖｅＫオペロン領域：

この領域はバチルス・ズブチリス１６８染色体の約３５１３１４９（ｙｖｆＦ）～３５２８１８４ｂｐ（ｙｖｅＫ）で見られる。本発明を用いて、染色体の３５１３１３７ｂｐ～３５２８８９６ｂｐに対応する、約１５．８ｋｂ断片を欠失した。この領域は推定多糖類をコードする（Ｄａｒｔｏｉｓ　ｅｔ　ａｌ．、バチルスに関する第７回国際会議（１９９３）Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｐａｓｔｅｕｒ［１９９３］、５６頁を参照）。この領域は以下の遺伝子を含む：ｙｖｆＡ－Ｆ、ｙｖｅＫ－Ｔ及びｓｌｒ。Ｂ．ズブチリス１６８染色体の約３５２９０１４～３５２９６０３で見られるｓｌｒ遺伝子領域は約５８９ｂｐの断片を包含する。この領域はｙｖｆＦ－ｙｖｅＫオペロンの調節領域である；

４）ＤＨＢオペロン領域：

この領域はバチルス・ズブチリス１６８染色体の約３２７９７５０（ｙｕｋＬ）～３２９３２０６ｂｐ（ｙｕｉＨ）で見られる。本発明を用いて、染色体の３２７９４１８ｂｐ～３２９２９２０ｂｐに対応する、約１３．０ｋｂ断片を欠失した。この領域はｃａｔｅｃｈｏｌｉｃ　ｓｉｄｅｒｏｐｈｏｎｅ２，３－ジヒドロキシ安息香酸－グリシン－トレオニン三量体エステルｂａｃｉｌｉｂａｃｔｉｎの生合成テンプレートをエンコードする（Ｍａｙ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６：７２０９－７２１７［２００１］を参照）。この領域は以下の遺伝子を含む：ｙｕｋＬ、ｙｕｋＭ、ｄｈｂＡ－Ｃ、Ｅ及びＦ及びｙｕｉＩ－Ｈ。

【０２３６】

上述の領域は欠失される好ましい固有染色体領域の例であるが、本発明のいくつかの実施態様において、当該領域の断片も欠失される。いくつかの実施態様において、当該断片は固有染色体領域の約１％～９９％を含む。他の実施態様において、断片は固有染色体領域の５％～９５％を含む。さらに別の実施態様において、断片は固有染色体領域の少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９０％、８８％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、５０％、４０％、３０％、２５％、２０％及び１０％を含む。

【０２３７】

Ｂ．ズブチリス１６８染色体における染色体上の位置に関してさらに欠失される固有染色体領域の断片の非限定的な例は以下を含む：

ａ）スキン領域について：
ｉ）約２６６６６６３～２６９３８０７の座標位置であって、ｙｑｃＣ～ｙｑａＭを含む、及び
ｉｉ）約２６５８４４０～２６５９６８８の座標位置であって、ｒａｐＥ～ｐｈｒＥを含む；
ｂ）ＰＢＳＸプロファージ領域について：
ｉ）約１３２００４３～１３４５２６３の座標位置であって、ｘｋｄＡ～ｘｋｄＸを含む、及び
ｉｉ）約１３２６６６２～１３４５１０２の座標位置であって、ｘｋｄＥ～ｘｋｄＷを含む；
ｃ）ＳＰβ領域について：
ｉ）約２１４９３５４～２２３７０２９の座標位置であって、ｘｋｄＡ～ｘｋｄＸを含む；
ｄ）ＤＨＢ領域について：
ｉ）約３２８２８７９～３２９１３５３の座標位置であって、ｄｈｂＦ～ｄｈｂＡを含む；
ｅ）ｙｖｆＦ－ｙｖｅＫ領域について
ｉ）約３５１６５４９～３５２２３３３の座標位置であって、ｙｖｆＢ～ｙｖｅＱを含み、
ｉｉ）約３５１３１８１～３５２８９１５の座標位置であって、ｙｖｆＦ～ｙｖｅＫを含み、及び
ｉｉｉ）約３５２１２３３～３５２８２０５の座標位置であって、ｙｖｅＱ～ｙｖｅＬを含む；
ｆ）プロファージ１領域について：
ｉ）約２１３９２６～２２００１５の座標位置であって、ｙｂｃＯ～ｙｂｄＥを含み、及び
ｉｉ）約２１４１４６～２２００１５の座標位置であって、ｙｂｃＰ～ｙｂｄＥを含む；
ｇ）プロファージ２領域について：
ｉ）約５４６８６７～５５９００５座標位置であって、ｒａｐＩ～ｃｓｐＣを含む；及び
ｈ）プロファージ４領域について：
ｉ）約１２６３０１７～６７５４２１座標位置であって、ｙｊｃＭ～ｙｄｊＪを含む。

【０２３８】

断片は同定した固有染色体領域よりも少ない２、３のｂｐｓのみからなることができるので、欠失に適した固有染色体領域の断片の数は多数ある。さらに、多くの同定された固有染色体領域は多数の遺伝子を包含する。当業者は特定の用途の使用のために固有染色体領域のどの断片を欠失させるのが適当かを容易に決定することができる。

【０２３９】

固有染色体領域の測定は多数の特定断片に隣接したヌクレオチドを排除することに関しては正確ではない。例えば、ＳＰβ領域はＢ．ズブチリス１６８染色体の座標２１５０８２４～２２８６２４６に位置するものとしてここで定義され、固有染色体領域はさらに１０～５０００ｂｐ、さらに１００～４０００ｂｐ、またはさらに１００～１０００ｂｐを当該領域の両側に含むことができる。当該領域の両側のｂｐの数は欠失の標的とされる固有染色体領域に含まれない他の遺伝子の存在により制限される。

【０２４０】

上述の通り、ここに開示する特定領域の位置はＢ．ズブチリス１６８染色体に関するものである。バチルス株由来のその他の類似領域は固有染色体領域の定義に含まれる。類似

領域は任意のバチルス株内で見られるが、特に好ましい類似領域はその他のバチルス・ズブチリス株、バチルス・リケニフォルミス株及びバチルス・アミロリケファシエンス株で見られる領域である。

【０２４１】

特定の実施態様において、１以上の固有染色体領域またはそれらの断片がバチルス株から欠失される。しかしながら、１以上の固有染色体領域またはそれらの断片の欠失は当該欠失を含む株の再生可能性に悪影響を与えるものではない。いくつかの実施態様において、２つの固有染色体領域またはそれらの断片が欠失される。別の実施態様において、３つの固有染色体領域またはそれらの断片が欠失される。さらに別の実施態様において、４つの固有染色体領域またはそれらの断片が欠失される。さらなる実施態様において、５つの固有染色体領域またはそれらの断片が欠失される。別の実施態様において、１４程度の固有染色体領域またはそれらの断片が欠失される。いくつかの実施態様において、固有染色体領域またはそれらの断片は連続しており、一方他の実施態様において、それらはバチルス染色体の別々の領域に位置する。

【０２４２】

欠失した固有染色体領域またはそれらの断片を含むバチルス属の任意のメンバー株は本発明で使用できる。いくつかの好ましい実施態様において、バチルス株はＢ．ズブチリス株、Ｂ．アミロリケファシエンス株、Ｂ．レンタス株及びＢ．リケニフォルミス株からなる群より選択される。いくつかの好ましい実施態様において、当該株は工業バチルス株であり、最も好ましくは工業Ｂ．ズブチリス株である。さらに好ましい実施態様において、変異バチルス株はプロテアーゼ生成株である。いくつかの特に好ましい実施態様において、前もってプロテアーゼ酵素をエンコードするポリヌクレオチドを含むように設計されたＢ．ズブチリス株である。

【０２４３】

上述の通り、固有染色体領域またはそれらの断片が欠失されたバチルス株はここで“変異バチルス株”という。本発明の特に好ましい実施態様において、変異バチルス株は目的タンパク質の発現レベルが増大している（すなわち、目的タンパク質の発現が同じ成長条件下で成長させた対応する非変異バチルス株と比較して増大している）。

【０２４４】

増大の１の指標は目的タンパク質の分泌である。いくつかの実施態様において、目的タンパク質の生成は対応する非変異バチルス株と比較して少なくとも０．５％、１．０％、１．５％、２．０％、２．５％、３．０％、４．０％、５．０％、８．０％、１０％、１５％、２０％及び２５％またはそれ以上、増大している。他の実施態様において、目的タンパク質の生成は、１リットル当たりに生成したタンパク質（ｇ）で測定すると対応する非変異バチルス株と比較して０．２５％～２０％、０．５％～１５％、及び１．０％～１０％増大している。

【０２４５】

固有染色体領域またはそれらの断片の欠失を含む本発明によって提供される変異バチルス株は任意の適当な方法により生成され、限定されないが以下の方法を含む。１の一般的な実施態様において、ＤＮＡ構築体をバチルス宿主中に導入する。ＤＮＡ構築体は不活性化染色体断片を含み、いくつかの実施態様において、さらに選択マーカーを含む。好ましくは、選択マーカーは不活性化染色体断片の５’及び３’末端の一部の両方に隣接している。

【０２４６】

いくつかの実施態様において、不活性化染色体断片は、好ましくは欠失される固有染色体領域（または当該領域の断片）のすぐ上流及び下流ヌクレオチドと１００％配列同一性を有するが、固有染色体領域の上流及び下流ヌクレオチドと約７０～１００％、約８０～１００％、約９０～１００％、及び約９５～１００％配列同一性を有する。不活性化染色体断片の各部分は、非変異宿主中で固有染色体領域と相同組換えするために、固有染色体領域の十分な５’及び３’フランキング配列を含まなければならない。

【０２４７】
いくつかの実施態様において、不活性化染色体断片の各部分は約５０～１０，０００塩基対（ｂｐ）を含む。しかしながら、より小さいまたは大きいｂｐ部分を本発明で用いることができる。好ましくは、各部分は約５０～５０００ｂｐ、約１００～５０００ｂｐ、約１００～３０００ｂｐ、１００～２０００ｂｐ、約１００～１０００ｂｐ、約２００～４０００ｂｐ、約４００～３０００ｂｐ、約５００～２０００ｂｐ、及び約８００～１５００ｂｐである。

【０２４８】
いくつかの実施態様において、選択マーカー及び不活性化染色体断片を含むＤＮＡ構築体はｉｎ　ｖｉｔｒｏで組み立てられ、続いてコンピテントバチルス宿主内に前記構築体を直接クローニングし、ＤＮＡ構築体がバチルス染色体内に統合されるようにする。例えば、ＰＣＲ融合及び／または連結はｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＤＮＡ構築体の組み立てに適している。いくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体は非プラスミド構築体であり、一方、他の実施態様において、ベクター内に組み込まれる（すなわち、プラスミド）。いくつかの実施態様において、環状プラスミドを用い、当該環状プラスミドは適当な制限酵素（すなわち、ＤＮＡ構築を阻害しないもの）を用いて切断する。従って、線形プラスミドは本発明で使用できる（例えば、図１；及び<u>Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ　ａｎｄ　ｏｔｈｅｒ　Ｇｒａｍ－Ｐｏｓｉｔｉｖｅ　Ｂａｃｔｅｒｉａ</u>（バチルス・ズブチリス及びその他のグラム陽性細菌）、Ｓｏｎｅｎｓｈｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、編集、Ａｍ．Ｓｏｃ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，ワシントン、ＤＣ［１９９３］のＰｅｒｅｇｏ、“Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎａｌ　Ｖｅｃｔｏｒｓ　ｆｏｒ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ　ｉｎ　Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ（バチルス・ズブチリスにおける遺伝子操作のための統合ベクター）”、を参照）。

【０２４９】
いくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体またはベクター、好ましくは不活性化染色体断片を含むプラスミドは非変異宿主中で固有染色体領域またはそれらの断片と相同組換えするために十分な量の固有染色体断片の５’及び３’フランキング配列（ｓｅｑ）またはそれらの断片を含む。他の実施態様において、ＤＮＡ構築体は当該構築体の上流及び下流末端で設計される制限酵素認識部位を含む。本発明に従い、座標位置に従い同定される有用なＤＮＡ構築体の非限定的な例は以下を含む：

１．ＰＢＳＸ領域を欠失するＤＮＡ構築体：［ｙｊｑＢ末端及びリボソーム結合部位（ＲＢＳ）を含むｙｊｐＣ全体を含む５’フランキング配列１３１８８７４－１３１９８６０ｂｐ］－マーカー遺伝子－［ｐｉｔのターミネーター及び上流部分を含む３’フランキング配列１３４８６９１－１３４９６５６ｂｐ］。

【０２５０】
２．プロファージ１領域を欠失するＤＮＡ構築体：［ＲＢＳ及びターミネーターを含むｇｌｍＳ全体及びｙｂｂＵ　ＲＢＳを含む５’フランキング配列２０１２４８－２０２１１２ｂｐ］－マーカー遺伝子－［ＲＢＳを含むｙｂｇｄ全体を含む３’フランキング配列２２０１４１－２２１１９５ｂｐ］。

【０２５１】
３．　プロファージ２領域を欠失するＤＮＡ構築体：［ｙｄｃＫ末端、以下のｔＲＮＡ全体：ｔｒｎＳ－Ａｓｎ、ｔｒｎＳ－Ｓｅｒ、ｔｒｎＳ－Ｇｌｕ、ｔｒｎＳ－Ｇｌｕ、ｔｒｎＳ－Ｌｅｕ１及びｔｒｎＳ－ｌｅｕ２を含む５’フランキング配列５２７９２５－５２９０６７ｂｐ］－マーカー遺伝子－［ｙｄｅＫ全体及びｙｄｅＬの上流部分を含む３’フランキング配列５６９５７８－５７１０６２ｂｐ］。

【０２５２】
４．　プロファージ４領域を欠失するＤＮＡ構築体：［ｙｊｃＭの一部を含む５’フランキング配列１２６３１２７－１２６４２７０ｂｐ］－マーカー遺伝子－［ＲＢＳを含むｙｊｏＢの一部を含む３’フランキング配列１３１３６６０－１３１４５８３ｂｐ］。

【０２５３】

５．　ｙｖｆＦ－ｙｖｅＫ領域を欠失するＤＮＡ構築体：［ｓｉｇＬの一部、ｙｖｆＦ全体及びｙｖｆＦの開始を含む５’フランキング配列３５１２０６１－３５１３１６１ｂｐ］－マーカー遺伝子－［ｓｌｒ全体及びｐｎｂＡの開始を含む３’フランキング配列３５２８８９６－３５２９８１０ｂｐ］。

【０２５４】

６．　ＤＨＢオペロン領域を欠失するＤＮＡ構築体：［ターミネーターを含むａｌｄ末端、ＲＢＳを含むｙｕｘｌＦ全体、ＲＢＳ及びターミネーターを含むｙｕｋＪ全体及びｙｕｋＬ全体を含む５’フランキング配列３２７８４５７－３２８０２５５ｂｐ］－マーカー遺伝子－［ＲＢＳを含むｙｕｉＨ末端、ＲＢＳ及びターミネーターを含むｙｕｉＧ全体及びターミネーターを含むｙｕｉＥ上流末端を含む３’フランキング配列３２９２９１９－３２９４０７６ｂｐ］。

【０２５５】

ＤＮＡ構築体はベクター内に組み込まれる、またはプラスミドＤＮＡなしで用いられるかに関わらず、微生物、好ましくは大腸菌細胞またはコンピテントバチルス細胞内に組み込まれる。

【０２５６】

プラスミド構築体を含むバチルス細胞内にＤＮＡを導入する及び大腸菌内にプラスミドを形質転換する方法は公知である。プラスミドは続いて大腸菌から単離され、バチルス内に形質転換される。しかしながら、大腸菌などの介在微生物を使用することは必須ではなく、いくつかの実施態様において、ＤＮＡ構築体またはベクターはバチルス宿主内に直接導入される。

【０２５７】

好ましい実施態様において、宿主細胞はバチルス種である（例えば、米国特許第５，２６４，３６６号、米国特許第４，７６０，０２５号及びＲＥ３４，６０６０を参照）。いくつかの実施態様において、目的のバチルス株はアルカロフィリック（Ａｌｋａｌｏｐｈｉｌｉｃ）バチルスである。多数のアルカロフィリックバチルス株が公知である（例えば、米国特許第５，２１７，８７８号；及びＡｕｎｓｔｒｕｐ　ｅｔ　ａｌ．、Ｐｒｏｃ　ＩＶ　ＩＦＳ：Ｆｅｒｍｅｎｔ．Ｔｅｃｈ．Ｔｏｄａｙ，２９９－３０５［１９７２］を参照）。特定の目的の他の種類のバチルス株は工業バチルス株の細胞である。工業バチルス株の例としては、限定されないが、Ｂ．リケニフォルミス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ズブチリス及びＢ．アミロリケファシエンスが挙げられる。別の実施態様において、バチルス宿主株は、Ｂ．リケニフォルミス、Ｂ．ズブチリス、Ｂ．レンタス、Ｂ．ブレビス、Ｂ．ステロサーモフィラス、Ｂ．アルカロフィラス、Ｂ．アミロリケファシエンス、Ｂ．コアグランス、Ｂ．サーキュランス、Ｂ．プミルス、Ｂ．チューリンゲンシス、Ｂ．クラウジイ及びＢ．メガテリウムからなる群より選択される。特に好ましい実施態様において、Ｂ．ズブチリス細胞を用いる。

【０２５８】

いくつかの実施態様において、工業宿主株はバチルス種の非組換え体株、対応する天然バチルス株の変異体及び組換えバチルス宿主株からなる群より選択される。好ましくは、宿主株は組換え宿主株であり、ここで目的ポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドは前もって宿主内に導入されている。さらに好ましい宿主株はバチルス・ズブチリス宿主株であり、特に組換えバチルス・ズブチリス宿主株である。多数のＢ．ズブチリス株が公知であり、本発明の使用に適している（例えば、１Ａ６（ＡＴＣＣ　３９０８５）、１６８（１Ａ０１）、ＳＢ１９、Ｗ２３、Ｔｓ８５、Ｂ６３７、ＰＢ１７５３～ＰＢ１７５８、ＰＢ３３６０、ＪＨ６４２、１Ａ２４３（ＡＴＣＣ　３９，０８７）、ＡＴＣＣ　２１３３２、ＡＴＣＣ　６０５１、ＭＩ１１３、ＤＥ１００（ＡＴＣＣ　３９，０９４）、ＧＸ４９３１、ＰＢＴ１１０及びＰＥＰ２１１株；Ｈｏｃｈ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、７３：２１５－２２８［１９７３］；米国特許第４，４５０，２３５号；米国特許第４，３０２，５４４号；ＥＰ０１３４０４８；Ｐａｌｖａ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅ、１９：８１－８７［１９８２］；Ｆａｈｎｅｓｔｏｃｋ　ａｎｄ　Ｆｉｓｃｈｅｒ，Ｊ

．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，（１９８６）１６５：７９６－８０４［１９８６］；及びＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅ　６９：３９－４７［１９８８］を参照）。発現宿主として特に興味深いのは、工業プロテアーゼ生成バチルス株である。これらの３つの株を用いることにより、プロテアーゼ生成に関する高効率は本発明の変異バチルス株によりさらに増大する。

【０２５９】

工業プロテアーゼ生成バチルス株は特に好ましい発現宿主を提供する。いくつかの実施態様において、本発明におけるこれらの株の使用は効率及びプロテアーゼ生成をさらに増大させる。上述の通り、２つの一般的なプロテアーゼの種類、すなわち中性（または“メタロプロテアーゼ”）及びアルカリ性（または“セリン”）プロテアーゼがあり、通常はバチルス種により分泌される。また、上述の通り、ズブチリシンは本発明の使用に好ましいセリンである。多種多様のズブチリシンが同定及び配列決定されており、例えば、ズブチリシン１６８、ズブチリシンＢＰＮ’、ズブチリシン・カールスバーグ、ズブチリシンＤＹ、ズブチリシン１４７、ズブチリシン３０９である（例えば、ＥＰ４１４２７９Ｂ；ＷＯ８９／０６２７９；及びＳｔａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１５９：８１１－８１８［１９８４］を参照）。本発明の１の実施態様において、バチルス宿主株は改変（例えば、変異体）プロテアーゼを生成する。多数の文献が変異体プロテアーゼの例及び引例を提供している（例えば、ＷＯ９９／２０７７０；ＷＯ／２０７２６；ＷＯ９９／２０７６９；ＷＯ８９／０６２７９；ＲＥ３４，６０６；米国特許第４，９１４，０３１号；米国特許第４，９８０，２８８号；米国特許第５，２０８，１５８号；米国特許第５，３１０，６７５号；米国特許第５，３３６，６１１号；米国特許第５，３９９，２８３号；米国特許第５，４４１，８８２号；米国特許第５，４８２，８４９号；米国特許第５，６３１，２１７号；米国特許第５，６６５，５８７号；米国特許第５，７００，６７６号；米国特許第５，７４１，６９４号；米国特許第５，８５８，７５７号；米国特許第５，８８０，０８０号；米国特許第６，１９７，５６７号及び米国特許第６，２１８，１６５号を参照）。

【０２６０】

さらに別の実施態様において、好ましいバチルス宿主はｄｅｇＵ、ｄｅｇＳ、ｄｅｇＲ及びｄｅｇＱの遺伝子の少なくとも１つにおいて変異または欠失を有するバチルス種である。好ましくは、変異はｄｅｇＵ遺伝子中にあり、より好ましくは変異はｄｅｇＵ（Ｈｙ）３２である。（例えば、Ｍｓａｄｅｋ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１７２：８２４－８３４［１９９０］；及びＯｌｍｏｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．，２５３：５６２－５６７［１９９７］を参照）。最も好ましい宿主株はｄｅｇＵ３２（Ｈｙ）変異を有するバチルス・ズブチリスである。さらなる実施態様において、バチルス宿主はｓｃｏＣ４（Ｃａｌｄｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８３：７３２９－７３４０［２００１］を参照）；ｓｐｏｌｌＥ（Ａｒｇｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，３１：１４０７－１４１５［１９９９］を参照）；ｏｐｐＡまたはその他のｏｐｐオペロン遺伝子（Ｐｅｒｅｇｏ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，５：１７３－１８５［１９９１］を参照）における変異または欠失を含む。実際に、ｏｐｐＡ遺伝子の変異と同じ表現型を生じるｏｐｐオペロンの変異が考えられ、本発明の変異バチルス株のいくつかの実施態様において使用できる。いくつかの実施態様において、これらの変異は単独で生じ、一方他の実施態様において、変異は組み合わせて存在する。いくつかの実施態様において、本発明の変異バチルスは上述の遺伝子の１以上の変異をすでに含むバチルス宿主株から得られる。別の実施態様において、本発明の変異バチルスはさらに、上述の遺伝子の１以上の変異を含むように設計される。

【０２６１】

いくつかの実施態様において、２以上のＤＮＡ構築体はバチルス宿主細胞内に導入され、変異バチルスの２以上の固有染色体領域の欠失を生じる。いくつかの実施態様において、これらの領域は連続しており（例えば、スキンとプロファージ７領域）、一方、他の実

施態様において、当該領域は分離している（例えば、ＰＢＳＸ領域及びＰＫＳ領域；スキン領域及びＤＨＢ領域；またはＰＫＳ領域、ＳＰβ領域及びｙｖｆＦ－ｙｖｅＫ領域）。

【０２６２】

当業者はポリヌクレオチド配列を細菌（例えば、大腸菌及びバチルス）細胞内に導入する適切な方法をよく把握している（例えば、Ｆｅｒｒａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．、“Ｇｅｎｅｔｉｃｓ”、ｉｎ　Ｈａｒｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．（編集）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｒｐ．［１９８９］、５７－７２頁；例えば、Ｓａｕｎｄｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１５７：７１８－７２６［１９８４］；Ｈｏｃｈ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，９３：１９２５－１９３７［１９６７］；Ｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．、１３：１３１－１３５［１９８６］；及びＨｏｌｕｂｏｖａ，Ｆｏｌｉａ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，３０：９７［１９８５］；Ｂ．ズブチリスについて、Ｃｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．，１６８：１１－１１５［１９７９］；Ｂ．メガテリウムについて、Ｖｏｒｏｂｊｅｖａ　ｅｔ　ａｌ．、ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．，７：２６１－２６３［１９８０］；Ｂ．アミロリケファシエンスについて、Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｐｐｌ．Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，５１：６３４（１９８６）；Ｂ．チューリンゲンシスについて、Ｆｉｓｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｒｃｈ．Ｍｉｃｔｏｂｉｏｌ．、１３９：２１３－２１７［１９８１］；及びＢ．スフェリカスについて、ＭｃＤｏｎａｌｄ，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１３０：２０３［１９８４］を参照）。実際に、プロトプラスト形質転換及び配向、形質導入及びプロプラスト融合などの形質転換の方法は公知であり、本発明での使用に適している。形質転換の方法は特に本発明により提供されるＤＮＡ構築体を宿主細胞内に導入するのに好ましい。

【０２６３】

一般的に用いられる方法に加えて、いくつかの実施態様において、宿主細胞は直接形質転換される（すなわち、媒介細胞を増幅のために用いず、または宿主細胞内への導入前にＤＮＡ構築のその他のプロセスを用いない）。ＤＮＡ構築体の宿主細胞内への導入は、プラスミドまたはベクター内への挿入なしでＤＮＡ構築体を宿主細胞に導入するための当業者に公知の物理的及び化学的方法を含む。当該方法は、限定されないが、塩化カルシウム沈殿法、エレクトロポレーション、裸のＤＮＡ（ｎａｋｅｄ　ＤＮＡ）、リポソーム等が挙げられる。別の実施態様において、ＤＮＡ構築体は、プラスミド内に導入されることなく、プラスミドを用いて共形質転換される。さらに別の実施態様において、選択マーカーは当業者に公知の方法により変異バチルス株から欠失または実質的に切除される（Ｓｔａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１５８：４１１－４１８［１９８４］；及びＰａｌｍｅｒｏｓ　ｅｔ　ａｌ．の保存部位特異的組換え［ＣＳＳＲ］方法、Ｐａｌｍｅｒｏｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅ　２４７：２５５－２６４［２０００］に記載、を参照）。いくつかの好ましい実施態様において、宿主染色体由来のベクター分解は固有染色体領域を除去しながら染色体中のフランキング領域を残す。

【０２６４】

いくつかの実施態様において、宿主細胞は変異バチルス株を生成するために本発明に従う１以上のＤＮＡ構築体を用いて形質転換され、ここで２以上の遺伝子が宿主細胞中で不活性化される。いくつかの実施態様において、２以上の遺伝子は宿主細胞染色体から欠失される。別の実施態様において、不活性化遺伝子は連続しており（欠失及び／または挿入による不活性化に関わらず）、一方他の実施態様において、連続した遺伝子ではない。

【０２６５】

上述の通り、細胞内及び細胞外発現ポリペプチド活性を検出及び測定するための当業者に公知の種々の分析法がある。特に、プロテアーゼに関して、吸光度２８０ｎｍで測定、またはＦｏｌｉｎ法を用いた比色分析により測定したカゼインまたはヘモグロビンからの酸溶性ペプチドの放出に基づく分析法がある（例えば、Ｂｅｒｇｍｅｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、“Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ　Ａｎａｌｙｓｉｓ”ｖｏｌ．５、Ｐｅｐｔｉｄａｓｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎａｓｅｓ　ａｎｄ　ｔｈｅｉｒ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏ

ｒｓ（ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、及びそれらの阻害因子）、Ｖｅｒｌａｇ　Ｃｈｅｍｉｅ、Ｗｅｉｎｈｅｉｍ「１９８４」を参照）。その他の分析法は発色基質の可溶化を含む（例えば、Ｗａｒｄ、“Ｐｒｏｔｅｉｎａｓｅｓ（プロテイナーゼ）”、Ｆｏｇａｒｔｙ（編集）、Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｅｎｚｙｍｅｓ　ａｎｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，ロンドン［１９８３］、２５１～３１７頁を参照）。その他の分析法の例としては、スクシニル－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｈｅ－ｐａｒａニトロアニリド分析（ＳＡＡＰＦｐＮＡ）及び２，４，６－トリニトロベンゼンスルフォン酸ナトリウム塩分析（ＴＮＢＳ分析）が挙げられる。他の当業者に公知の多数の文献が適切な方法を提供する（例えば、Ｗｅｌｌｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１１：７９１１－７９２５［１９８３］；Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２２３：１１９－１２９［１９９４］；及びＨｓｉａ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｎａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２４２：２２１－２２７［１９９９］を参照）。

【０２６６】

上述の通り、宿主細胞中の目的タンパク質の分泌レベルの決定方法及び発現タンパク質の検出方法は当該タンパク質に特異なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いる免疫学的分析法の使用を含む。例としては、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、蛍光免疫分析法（ＦＩＡ）、及び蛍光活性化細胞分類法（ＦＡＣＳ）を含む。しかしながら、その他の方法も当業者に公知であり、目的タンパク質の評価に使用できる（例えば、Ｈａｍｐｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，ＡＰＳ　Ｐｒｅｓｓ、Ｓｔ．Ｐａｕｌ，ＭＮ［１９９０］；及びＭａｄｄｏｘ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１５８：１２１１［１９８３］を参照）。いくつかの好ましい実施態様において、目的タンパク質の分泌は、対応する非変異宿主よりも本発明を用いて得た変異株におけるほうが高い。当業界で公知の通り、本発明を用いて生成した変異バチルス細胞は発現及び細胞培養物からの目的ポリペプチドの回収に適した条件下で維持及び成長する（例えば、Ｈａｒｗｏｏｄ　ａｎｄ　Ｃｕｔｔｉｎｇ（編集）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｂａｃｉｌｌｕｓ（バチルスの分子生物学的方法）、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ［１９９０］を参照）。

【０２６７】

本発明を実施する手段及び方法は以下の実施例を参照することにより、当業者により十分理解されるものであり、当該実施例は本発明の範囲またはその請求の範囲をいかなる方法によっても限定するものではない。

【０２６８】

実験

以下の実施例は特定の好ましい実施態様及び本発明の特徴を示し、さらに説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるものではない。

【０２６９】

実験の開示において、以下の通り、以下の略語を適用する：℃（摂氏度）；ｒｐｍ（１分間当たりの回転数）；H_2O（水）；dH_2O（脱イオン水）；ＨＣｌ（塩酸）；ａａ（アミノ酸）；ｂｐ（塩基対）；ｋｂ（キロ塩基対）；ｋＤ（キロドルトン）；ｇｍ（グラム）；μｇ（マイクログラム）；ｍｇ（ミリグラム）；ｎｇ（ナノグラム）；μｌ（マイクロリットル）；ｍｌ（ミリリットル）；ｍｍ（ミリメーター）；ｎｍ（ナノメーター）；μｍ（マイクロメーター）；Ｍ（モル濃度）；ｍＭ（ミリモル濃度）；μＭ（マイクロモル濃度）；Ｕ（単位）；Ｖ（ボルト）；ＭＷ（分子量）；ｓｅｃ（秒）；ｍｉｎ（ｓ）（分）；ｈｒ（ｓ）（時間）；$MgCl_2$（塩化マグネシウム）；ＮａＣｌ（塩化ナトリウム）；OD_{280}（２８０ｎｍでの光学密度）；OD_{600}（６００ｎｍでの光学密度）；ＰＡＧＥ（ポリアクリルアミドゲルエレクトロフォレーシス）；ＰＢＳ（リン酸緩衝生理食塩水［１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　リン酸ナトリウム緩衝液、ｐＨ７．２

］）；ＰＥＧ（ポリエチレングリコール）；ＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）；ＲＴ－ＰＣＲ（逆転写ＰＣＲ）；ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）；Ｔｒｉｓ（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）；ｗ／ｖ（体積当たり重量）；ｖ／ｖ（体積対体積）；ＬＡ培地（リットル当たり：Ｄｉｆｃｏトリプトン・ペプトン　２０ｇ、Ｄｉｆｃｏ酵母抽出物　１０ｇ、ＥＭサイエンス　ＮａＣｌ　１ｇ、ＥＭサイエンス　寒天１７．５ｇ、ｄＨ２０～１Ｌ）；ＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、ロックビル、メリーランド州）；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ（ＣＬＯＮＴＥＣＨラボラトリーズ、パロ・アルト、カリフォルニア州）；Ｄｉｆｃｏ（Ｄｉｆｃｏラボラトリーズ、デトロイト、ミシガン州）；ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬまたはＧｉｂｃｏ　ＢＲＬ（ライフ・テクノロジーズ、Ｉｎｃ．，ゲーサーズバーグ、ＭＤ）；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，サンディエゴ、カリフォルニア州）；ＮＥＢ（ニューイングランド　Ｂｉｏｌａｂｓ、ビバリー、マサチューセッツ州）；Ｓｉｇｍａ（シグマ・ケミカル　Ｃｏ．，セントルイス、ミズーリ州）；Ｔａｋａｒａ（タカラ・バイオ　Ｉｎｃ．Ｏｔｓｕ，日本）；Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｒｏｃｈｅ（ロシュ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｆ．Ｈｏｆｆｍａｎｎ　Ｌａ　Ｒｏｃｈｅ部門、Ｌｔｄ．，Ｂａｓｅｌ、スイス）；ＥＭサイエンス（ＥＭサイエンス、Ｇｉｂｂｓｔｏｗｎ，ニュージャージー州）；Ｑｉａｇｅｎ（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，バレンシア、カリフォルニア州）；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ，ラ・ホーヤ、カリフォルニア州）；Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ、サンタクララ、カリフォルニア州）。

【０２７０】

実施例１

欠失株の作成

この実施例は“方法１”について説明し、図１にも示される。この方法では、バチルス株内に形質転換されるＤＮＡ構築体を運ぶｐＪＭ１０２プラスミドベクターを生成するために大腸菌を用いた（Ｐｅｒｅｇｏ、上述を参照）。欠失部位の５’及び３’末端にすぐ隣接する領域をＰＣＲ増幅した。ＰＣＲプライマーを約３７塩基対長さになるように設計し、バチルス・ズブチリス染色体に相同な３１塩基対及びプライマーの５’末端から６塩基対に位置する６塩基対の制限酵素認識部位を含むようにした。プライマーを当該構築体の上流及び下流末端の固有制限酵素認識部位及びクローニング使用のための２つの断片間のＢａｍＨＩ部位構築のため設計した。抗菌マーカーのためのプライマーは当該断片の両側末端にＢａｍＨＩ部位を含んだ。可能であれば、ＰＣＲプライマーは欠失固有染色体領域のプロモーターを除去するが、隣接領域の全てのターミネーターを残すように設計した。染色体配列、遺伝子決定、及びプロモーター及びターミネーター情報の主な供給源はＫｕｎｓｔ　ｅｔ　ａｌ．、（１９９７）上述から得ており、また当業者に公知のＳｕｂｔｉＬｉｓｔワールドワイドウェブサーバーからも入手可能である（例えば、Ｍｏｓｚｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、上述を参照）。本発明を用いて多数の欠失を作った。本発明により作成した欠失からのプライマー配列リストを表１に示す。また、プライマー命名システムの説明に関して図２も参照されたい。

【表１】

表１．　プライマー

ﾌﾟﾗｲﾏｰ名	ﾌﾟﾗｲﾏｰ内に設計された制限酵素	プライマー配列	配列番号
PBSX-UF	XbaI	CTACATTCTAGACGATTTGTTTGATCGATATGTGGAAGC	60
PBSX-UR	BamHI	GGCTGAGGATCCATTCCTCAGCCCAGAAGAGAACCTA	61
PBSX-DF	BamHI	TCCCTCGGATCCGAAATAGGTTCTGCTTATTGTATTCG	62
PBSX-DR	SacI	AGCGTTGAGCTCGCGCCATGCCATTATATTGGCTGCTG	63
ﾌｧｰｼﾞ 1-	EcoRI	GTGACGGAATTCCACGTGCGTCTTATATTGCTGAGCTT	64
ﾌｧｰｼﾞ 1-	BamHI	CGTTTTGGATCCAAAAACACCCCTTTAGATAATCTTAT	65
ﾌｧｰｼﾞ 1-	BamHI	ATCAAAGGATCCGCTATGCTCCAAATGTACACCTTTCCGT	66
ﾌｧｰｼﾞ 1-	PstI	ATATTTCTGCAGGCTGATATAAATAATACTGTGTGTTCC	67
ﾌｧｰｼﾞ 2-	SacI	CATCTTGAATTCAAAGGGTACAAGCACAGAGACAGAG	68
ﾌｧｰｼﾞ 2-	BamHI	TGACTTGGATCCGGTAAGTGGGCAGTTTGTGGGCAGT	69
ﾌｧｰｼﾞ 2-	BamHI	TAGATAGGATCCTATTGAAAACTGTTTAAGAAGAGGA	70
ﾌｧｰｼﾞ 2-	PstI	CTGATTCTGCAGGAGTGTTTTTGAAGGAAGCTTCATT	71
ﾌｧｰｼﾞ 4-	KpnI	CTCCGCGGTACCGTCACGAATGCGCCTCTTATTCTAT	72
ﾌｧｰｼﾞ 4-	BamHI	TCGCTGGGATCCTTGGCGCCGTGGAATCGATTTTGTCC	73
ﾌｧｰｼﾞ 4-	BamHI	GCAATGGGATCCTATATCAACGGTTATGAATTCACAA	74
ﾌｧｰｼﾞ 4-	PstI	CCAGAACTGCAGGAGCGAGGCGTCTCGCTGCCTGAAA	75
PPS-UF	SacI	GACAAGGAGCTCATGAAAAAAAGCATAAAGCTTTATGTTGC	76
PPS-UR	BamHI	GACAAGGGATCCCGGCATGTCCGTTATTACTTAATTTC	77
PPS-DF	BamHI	GACAAGGGATCCTGCCGCTTACCGGAAACGGA	78
PPS-DR	XbaI	GACAAGTCTAGATTATCGTTTGTGCAGTATTACTTG	79
SPβ-UF	SacI	ACTGATGAGCTCTGCCTAAACAGCAAACAGCAGAAC	80
SPβ-UR	BamHI	ACGAATGGATCCATCATAAAGCCGCAGCAGATTAAATAT	81
SPβ-DF	BamHI	ACTGATGGATCCATCTTCGATAAATATGAAAGTGGC	82
SPβ-DR	XbaI	ACTGATTCTAGAGCCTTTTTCTCTTGATGCAATTCTTC	83
PKS-UF	XbaI	GAGCCTCTAGAGCCCATTGAATCATTTGTTT	84
PKS-UR	BamHI	GAGCCGGATCCTTAAGGATGTCGTTTTTGTGTCT	85
PKS-DF	BamHI	GAGCCGGATCCATTTCGGGGTTCTCAAAAAAA	86
PKS-DR	SacI	GAGCCGAGCTCATGCAAATGGAAAAATTGAT	87
ｽｷﾝ-UF	XbaI	GAAGTTCTAGAGATTGTAATTACAAAAGGGGGGTG	88
ｽｷﾝ-UR	BamHI	GAAGTGGATCCTTTCACCGATCATAAAAGCCC	89
ｽｷﾝ-DF	BamHI	TGAAAGGATCCATTTTTCATTGATTGTTAAGTC	90
ｽｷﾝ-DR	SacI	GAAGTTAGAGCTCGGGGGGGCATAAATTTCCCG	91
Phleo-UF	BamHI	GCTTATGGATCCGATACAAGAGAGGTCTCTCG	92
Phleo-DR	BamHI	GCTTATGGATCCCTGTCATGGCGCATTAACG	93
Spec-UF	BamHI	ACTGATGGATCCATCGATTTTCGTTCGTGAATACATG	94
Spec-DR	BamHI	ACTGATGGATCCCATATGCAAGGGTTTATTGTTTTC	95
CssS-UF	XbaI	GCACGTTCTAGACCACCGTCCCCTGTGTTGTATCCAC	96
CssS-UR	BamHI	AGGAAGGGATCCAGAGCGAGGAAGATGTAGGATGATC	97
CssS-DF	BamHI	TGACAAGGATCCTGTATCATACCGCATAGCAGTGCC	98

【０２７１】

CssS-DR	SacI	TTCCGCGAGCTCGGCGAGAGCTTCAGACTCCGTCAGA	99
SBO-	XbaI	GAGCCTCTAGATCAGCGATTTGACGCGGCGC	100
SBO-	BamHI	TTATCTGGATCCCTGATGAGCAATGATGGTAAGATAGA	101
SBO-	BamHI	GGGTAA GGATCC CCCAAAAGGGCATAGTCATTCTACT	102
SBO-	Asp718	GAGATCGGTACC CTTTTGGGCCATATCGTGGATTTC	103
PhrC-UF	HindIII	GAGCC AAGCTT CATTGACAGCAACCAGGCAGATCTC	104
PhrC-DF	PstI	GCTTATAAGCTTGATACAAGAGAGGTCTCTCG	105
PhrC-UR	PstI	GCTTATAAGCTTCTGTCATGGCGCATTAACG	106
PhrC-DR	SacI	GAGCCGAGCTC CATGCCGATGAAGTCATCGTCGAGC	107
PhrC-UF-	HindIII	CGTGAA AAGCTT TCGCGGGATGTATGAATTTGATAAG	108
PhrC-DR-	SacI	TGTAGGGAGCTC GATGCGCCACAATGTCGGTACAACG	109

制限酵素認識部位を以下の通り指定する： XbaI は TCTAGA；BamHI は GGATCC；SacI は GAGCTC；Asp718 は GGTACC；PstI は CTGCAG 及び HindIII は AAGCTT。また、ﾌﾟﾛﾌｧｰｼﾞは"P ﾌｧｰｼﾞ"とする。

【０２７２】
この方法では、１００μＬ　ＰＣＲ反応を８４μＬ水、１０μＬ　ＰＣＲ緩衝液、１μＬの各プライマー（すなわち、ＰＫＳ－ＵＦ及びＰＫＳ－ＵＲ）、２μＬのｄＮＴＰｓ、１μＬの野生型バチルス染色体ＤＮＡテンプレート、及び１μＬのポリメラーゼを含む１５０μＬのエッペンドルフチューブ中で行った。使用したＤＮＡポリメラーゼはＴａｑ　Ｐｌｕｓ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ポリメラーゼ及びＨｅｒｃｕｌａｓｅ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を含ませた。反応は以下のプログラムを用いてハイブリッドＰＣＲエキスプレス熱サイクラー中で行った。サンプルは最初に９４℃で５分間加熱し、それから冷却して５０℃に保った。ポリメラーゼをこの時点で加えた。２５サイクルの増幅は９５℃で１分間、５０℃で１分、及び７２℃で１分からなる。最終的に７２℃で１０分間行うことにより、伸長完了を確実にした。サンプルを分析のため４℃で保存した。

【０２７３】
ＰＣＲ完了後、１０μｌの各反応をＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１．２％　アガロースＥ－ゲル上で、６０ボルト、３０分間で行い、正しいサイズのバンドの存在を確認した。ここに記載する全てのゲルエレクトロフォレーシス法はこれらの条件を用いた。バンドが存在する場合、反応チューブの残余物は製造メーカーの取扱説明書に従いＱｉａｇｅｎ　Ｑｉａｑｕｉｃｋ（登録商標）ＰＣＲ精製キットを用いて精製し、それから、適当な制限酵素対を用いて切断した。消化を３７℃、１時間、９μＬの水、、２μＬの１０×ＢＳＡ、２μＬの適当なＮＥＢ制限緩衝液（２０００－０１　ＮＥＢカタログ及び技術文献に従う）、５μＬのテンプレート、及び１μＬの各制限酵素からなる２０μＬの反応として行った。例えば、ＰＢＳＸ上流断片及びＣｓｓＳ上流断片をＮＥＢ（ニューイングランド・バイオラボ）制限緩衝液Ｂ中でＸｂａｌ及びＢａｍＨＩを用いて切断した。消化断片をゲル・エレクトロフォレーシス及び製造メーカー取扱説明書に従いＱｉａｇｅｎ　Ｑｉａｑｕｉｃｋゲル抽出キットを用いた抽出により精製した。図５及び６は種々の欠失の結果を示すゲルを表す。

【０２７４】
プラスミドベクター内への断片の連結は２つの工程で行われ、製造メーカー取扱説明書に従ってＴａｋａｒａ連結キットまたはＴ４ＤＮＡリガーゼ（反応内容：５μＬ　各挿入断片、１μＬ　切断ｐＪＭ１０２プラスミド、３μＬ　Ｔ４ＤＮＡリガーゼ緩衝液及び１μＬ　Ｔ４ＤＮＡリガーゼ）を用いる。まず、切断上流及び下流断片をｐＪＭ１０２プラスミド・ポリリンカー中の固有制限酵素認識部位内に１５℃で一晩中連結させ、共通ＢａｍＨＩ部位で接続し、環状プラスミドを再形成させた。ｐＪＭ１０２プラスミドを各欠失に適した固有制限酵素認識部位を用いて切断し（表２を参照；ｃｓｓＳ、Ｘｂａｌ及びＳ

ａｃｌを用いた）、連結前に上述の通り精製した。この再環状化プラスミドをＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎの“Ｔｏｐ　Ｔｅｎ”大腸菌細胞内に形質転換し、製造メーカーのワン・ショット形質転換手順を用いた。

【０２７５】

形質転換体は１．５％寒天（ＬＡ）とブルーホワイトスクリーニングのためのＸ－ｇａｌを含んだ５０ｐｐｍカルバニリシン（ｃａｒｂａｎｉｃｉｌｌｉｎ）を用いて凝固したＬＢ培地上で選択した。クローンを採取し、５ｍｌのＬＢ培地（Ｌｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ）プラス５０ｐｐｍカルバニシリン（ｃａｒｂａｎｉｃｉｌｌｉｎ）中、３７℃で一晩中成長させ、プラスミドをＱｉａｇｅｎ’ｓ　Ｑｉａｑｕｉｃｋ　ミニー準備キットを用いて単離した。制限分析により、挿入の各末端で制限酵素認識部位を用いて切断し、プラスミドから約２ｋｂのバンドにすることにより挿入の存在を確認した。挿入を確認したプラスミドはＢａｍＨＩを用いて切断し、上述の通り消化反応において線形化し（第２の制限酵素に代えてさらに１μＬの水を用いて）、再環状化を防止するために１μＬの子牛の腸（ｃａｌｆ　ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ）ホスファターゼ及びｓｈｒｉｍｐホスファターゼを用いて１時間、３７℃で処理し、及び表２に記載するように抗菌剤耐性マーカーに連結させた。抗菌剤耐性マーカーはＢａｍＨＩを用いて切断し、連結前に製造メーカー取扱説明書に従いＱｉａｇｅｎゲル抽出キットを用いて洗浄した。このプラスミドを既に述べたように大腸菌内にクローンし、選択に応じて適切な、５ｐｐｍのフレオマイシン（ｐｈｌ）または１００ｐｐｍのスペクチノマイシン（ｓｐｃ）を用いる。単離プラスミド中のマーカー挿入の確認は上述の通り、ＢａｍＨＩを用いる制限分析により行った。Ｂ．ズブチリス内への形質転換前に、プラスミドをＳｃａｌを用いて線形化し、二重交差結合を確実にさせた。

【表２】

表２．　欠失構築体で使用される固有制限酵素ペア

欠失名	固有制限酵素ﾍﾟｱ	抗菌ﾏｰｶｰ
Sbo	XbaI-Asp718	spc
Slr	XbaI – SacI	phleo
YbcO	XbaI – SacI	spc
Csn	XbaI – SalI	phleo
PBSX	XbaI-SacI	phl
PKS	XbaI-SacI	phl
SPβ	XbaI-SacI	spec
PPS	XbaI-SacI	spec
ｽｷﾝ	XbaI-SacI	phl

【０２７６】

実施例２

<u>大腸菌をバイパスするためにＰＣＲ融合を用いるＤＮＡ構築体の作成</u>

この実施例は“方法２”について説明し、また図３にも示される。プライマーが抗菌マーカーのプライマー配列に相補的な２５ｂｐ“テイル”を用いて設計されること以外は、上流及び下流断片は方法１の通り増幅する。“テイル”とは、直接増幅される配列に相同

でないが、他のＤＮＡ配列に相補的であるプライマーの５’末端上の塩基対としてここで定義する。同様に、抗菌剤を増幅するためのプライマーは断片プライマーに相補的な“テイル”を含む。任意の所定欠失について、欠失Ｘ－ＵＦｆｕｓ及び欠失Ｘ－ＵＲｆｕｓは互いに直接の相補体である。これは、ＤＦ－ｆｕｓとＤＲ－ｆｕｓプライマーセットに関しても当てはまる。さらに、いくつかの実施態様において、これらのプライマーはプラスミドベクター作成で使用する方法１において用いたものに類似した制限酵素認識部位を含む（表３及び米国特許第５，０２３，１７１号を参照）。表３はＰＣＲ融合による欠失構築体の作成に有用なプライマーのリストを提供する。表４はＰＣＲ融合による欠失構築体の作成に有用な別のプライマーのリストを提供する。しかしながら、この表では、全ての欠失構築体はｐｈｌｅｏ^{R}マーカーを含む。

【表３】

表３．　プライマー

ﾌﾟﾗｲﾏｰ名	ﾌﾟﾗｲﾏｰ内に設計された制限酵素	配列	配列番号
DHB-UF	Xbal	CGAGAATCTAGAACAGGATGAATCATCTGTGGCGGG	110
DHB-UFfus-phleo	BamHI	CGACTGTCCAGCCGCTCGGCACATCGGATCCGCTTA CCGAAAGCCAGACTCAGCAA	111
DHB-URfus-phleo	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCCGATGTG CCGAGCGGCTGGACAGTCG	112
DHB-DFfus-phleo	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCCCACAA GCCCGCACGCCTTGCCACAC	113
DHB-DRfus-phleo	BamHI	GTGTGGCAAGGCGTGCGGGCTTGTGGGATCCTCATG GCTGTCATGGCGCATTAACG	114
DHB-DR	Sacl	GACTTCGTCGACGAGTGCGGACGGCCAGCATCACCA	115
DHB-UF-ﾈｽﾃｨﾄﾞ	Xbal	GGCATATCTAGAGACATGAAGCGGGAAACAGATG	116
DHB-DR-ﾈｽﾃｨﾄﾞ	Sacl	GGTGCGGAGCTCGACAGTATCACAGCCAGCGCTG	117
YvfF-yveK-UF	Xbal	AAGCGTTCTAGACTGCGGATGCAGATCGATCTCGGG	118
YvfF-yveK-UF-phleo	BamHI	AACCTTCCGCTCACATGTGAGCAGGGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	119
YvfF-yveK-UR-phleo	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC CCTGCTCACATGTGAGCGGAAGGTT	120
YvfF-yveK-DF-phleo	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GCCTTCAGCCTTCCCGCGGCTGGCT	121
YvfF-yveK-DR-phleo	BamHI	AGCCAGCCGCGGGAAGGCTGAAGGCGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	122
YvfF-yveK-DR	Pstl	CAAGCACTGCAGCCCACACTTCAGGCGGCTCAGGTC	123
YvfF-yveK-UF-	Xbal	GAGATATCTAGAATGGTATGAAGCGGAATTCCCG	124
YvfF-yveK-DR-	Kpnl	ATAAACGGTACCCCCCTATAGATGCGAACGTTAGCCC	125
ﾌﾟﾛﾌｧｰｼﾞ7-UF	EcoRI	AAGGAGGAATTCCATCTTGAGGTATACAAACAGTCAT	126
ﾌﾟﾛﾌｧｰｼﾞ 7-UF-	BamHI	TCTCCGAGAAAGACAGGCAGGATCGGGATCC	127
ﾌﾟﾛﾌｧｰｼﾞ 7-UR-	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC	128
ｽｷﾝ＋ﾌﾟﾛﾌｧｰｼﾞ 7-	Asp718	AAGGACGGTACCGGCTCATTACCCTCTTTTCAAGGGT	129
ｽｷﾝ +pro7-UF-phleo	BamHI	ACCAAAGCCGGACTCCCCCGCGAGAGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	130
ｽｷﾝ +pro7-UR-phleo	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC TCTCGCGGGGGAGTCCGGCTTTGGT	131
ｽｷﾝ +pro7-DF-phleo	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGA GGATCCCATACGGGGTACACAATGTACCATA	132
ｽｷﾝ +pro7-DR-phleo	BamHI	TATGGTACATTGTGTACCCCGTATGGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	133
ｽｷﾝ +pro7-DR	Pstl	GTCAACCTGCAGAGCGGCCCAGGTACAAGTTGGGGA	134
ｽｷﾝ +pro7-UF-	Sacl	GGATCAGAGCTCGCTTGTCCTCCTGGGAACAGCCGG	135
ｽｷﾝ +pro7-DR-	Pstl	TATATGCTGCAGGGCTCAGACGGTACCGGTTGTTCCT	136

制限酵素認識部位は以下の通り指定される： XbaI は TCTAGA；BamHI は GGATCC；SacI は GAGCTC；Asp718 は GGTACC；PstI は CTGCAG 及び HindIII は AAGCTT。

【表４】

表４．　PCR 融合*により欠失構築体を作成するために用いる追加プライマー

ﾌﾟﾗｲﾏｰ名	ﾌﾟﾗｲﾏｰ内に設計された制限酵素	配列	配列番号
Slr-UF	XbaI	CTGAACTCTAGACCTTCACCAGGCACAGAGGAGGTGA	137
Slr-Uffus	BamHI	GCCAATAAGTTCTCTTTAGAGAACAGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	138
Slr-Urfus	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCCTTGTTCTCT AAAGAGAACTTATTGGC	139
Slr-Dffus	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GGGCTAACGTTCGCATCTATAGGGG	140
Slr-Drfus	BamHI	CCCCTATAGATGCGAACGTTAGCCC GGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	141
Slr-DR	SacI	TGAGACGAGCTCGATGCATAGGCGACGGCAGGGCGCC	142
Slr-UF-ﾈｽﾃｨﾄﾞ	XbaI	CGAAATTCTAGATCCCGCGATTCCGCCCTTTGTGG	143
Slr-DR-ﾈｽﾃｨﾄﾞ	SacI	TTCCAAGAGCTCGCGGAATACCGGAAGCAGCCCC	144
YbcO-UF	XbaI	CAATTCTCTAGAGCGGTCGGCGCAGGTATAGGAGGGG	145
YbcO-UF	BamHI	GAAAAGAAACCAAAAAGAATGGGAAGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	146
YbcO-UR	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC TTCCCATTCTTTTTGGTTTCTTTTC	147
YbcO-DF	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GCTATTTAACATTTGAGAATAGGGA	148
YbcO-DR	BamHI	TCCCTATTCTCAAATGTTAAATAGCGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	149
YbcO-DR	SacI	CAGGCGGAGCTCCCATTTATGACGTGCTTCCCTAAGC	150
Csn-UF	XbaI	TACGAATCTAGAGATCATTGCGGAAGTAGAAGTGGAA	151
Csn-UF	BamHI	TTTAGATTGAGTTCATCTGCAGCGGGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	152
Csn-UR	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC CCGCTGCAGATGAACTCAATCTAAA	153
Csn-DF	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GCCAATCAGCCTTAGCCCCTCTCAC	154
Csn-DR	BamHI	GTGAGAGGGGCTAAGGCTGATTGGCGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	155
Csn-DR	SalI	ATACTCGTCGACATACGTTGAATTGCCGAGAAGCCGC	156
Csn-UF-	なし	CTGGAGTACCTGGATCTGGATCTCC	157
Csn-DR-	なし	GCTCGGCTTGTTTCAGCTCATTTCC	158
SigB-UF	SacI	CGGTTTGAGCTCGCGTCCTGATCTGCAGAAGCTCATT	159
SigB-UF	BamHI	CTAAAGATGAAGTCGATCGGCTCATGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	160
SigB-UR	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC ATGAGCCGATCGACTTCATCTTTAG	161

【０２７７】

SigB-DF	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GAAGATCCCTCGATGGAGTTAATGT	162
SigB-DR	BamHI	ACATTAACTCCATCGAGGGATCTTCGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	163
SigB-DR	SalI	GCTTCGGTCGACTTTGCCGTCTGGATATGCGTCTCTCG	164
SigB-UF-	SacI	GTCAAAGAGCTCTATGACAGCCTCCTCAAATTGCAGG	165
SigB-DR-	SalI	TTCCATGTCGACGCTGTGCAAAACCGCCGGCAGCGCC	166
SpoIISA-UF	EcoRI	ACATTCGAATTCAGCAGGTCAATCAGCTCGCTGACGC	167
SpoIISA-UF	BamHI	CCAGCACTGCGCTCCCTCACCCGAAGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	168
SpoIISA-UR	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC TTCGGGTGAGGGAGCGCAGTGCTGG	169
SpoIISA-DF	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC TCGAGAGATCCGGATGGTTTTCCTG	170
SpoIISA-DR	BamHI	CAGGAAAACCATCCGGATCTCTCGAGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	171
SpoIISA-DR	HindIII	AGTCAT AAGCTTTCTGGCGTTTGATTTCATCAACGGG	172
SpoIISA-UF-	なし	CAGCGCGACTTGTTAAGGGACAATA	173
SpoIISA-DR-	なし	GGCTGCTGTGATGAACTTTGTCGGA	174

*全ての欠失構築体は $phleo^R$ マーカーを含む

【０２７８】

上述の通りゲル・エレクトロフォレーシスにより表３及び４に記載した断片の大きさを確認した。正しい場合には、１μＬの各上流、下流及び抗菌剤耐性マーカー断片を記載された欠失Ｘ－ＵＦ及び欠失Ｘ－ＤＲプライマーまたはネスティドプライマーを含む１の反応管に加えた。ネスティドプライマーは上流または下流断片の内部に相同な２５塩基対のＤＮＡであり、通常、当該断片の外側末端由来の約１００塩基対である（図２を参照）。ネスティドプライマーの使用は融合成功度を高めることが多い。ＰＣＲ反応成分は、８２μＬの水をテンプレート体積を追加して補うために用いた以外は上述のものに類似した。ＰＣＲ反応条件は７２℃の伸長を３分に延長した以外は、上述のものと類似した。伸長の間、抗菌剤耐性遺伝子を上流と下流断片間に融合した。この融合断片は、精製工程を用いずに、または製造メーカー取扱説明書に従って行われるＱｉａｇｅｎ　Ｑｉａｑｕｉｃｋ　ＰＲＣ精製を用いてバチルス内に直接統合できる。

【０２７９】

実施例３

ＰＣＲ断片の連結を用いるＤＮＡ構築体の作成及び大腸菌クローニングをバイパスするためのバチルス・ズブチリスの直接形質転換

この実施例では、ＰＣＲ断片の連結を用いるＤＮＡ構築体を作成するための方法（“方法３”）及びバチルスの直接形質転換について説明する。例として、ｐｒｐＣ、ｓｉｇＤ及びｔｄｈ／ｋｂｌの修飾を連結方法を示すために提供する。実際に、ｓｉｇＤ及びｔｄｈ／ｋｂｌを１の方法で構築し、ｐｒｐＣを別の方法により構築した。

【０２８０】

Ａ．Ｔｄｈ／Ｋｂｌ及びＳｉｇＤ

バチルス・ズブチリス染色体のｔｄｈ／ｋｂｌ領域に隣接した上流及び下流断片を、フランキングＤＮＡの内部プライマーがＩＩ型の制限酵素認識部位を含むように設計した以外は方法１に記載した類似のＰＣＲにより増幅した。ｌｏｘＰ－スペクチノマイシン－ｌｏｘＰカセットのプライマーをフランキング及び相補的突出部と同じＩＩ型制限酵素認識部位を用いて設計した。左側面及び右側面の固有突出部は上流及び下流のフランキングＤ

ＮＡ間の抗菌カセットの直接連結を可能にする。全てのＤＮＡ断片は適当な制限酵素により消化し、当該断片を製造メーカー取扱説明書を用いてＱｉａｇｅｎ　Ｑｉａｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットで精製した。この精製に続いて、ＢｉｏＲａｄ　Ｐ－６ゲルを含む１ｍＬの回転カラム中で脱塩を行い、２ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５で釣り合いを取った。断片をＳａｖａｎｔ　Ｓｐｅｅｄ　Ｖａｃ　ＳＣ１１０システムを用いて１２４～２５０ｎｇ／μＬに濃縮した。０．８～１μｇの各断片の３つの断片連結を、１６時間、１４～１６℃で１５～２５μＬ反応体積中で１２Ｕ　Ｔ４リガーゼ（ロシュ）を用いて行った。所望の連結生成物の合計収量は、アガロースゲル上の標準ＤＮＡラダー（ｌａｄｄｅｒ）との比較により評価して、反応当たり１００ｎｇより大きかった。当該連結混合物は形質転換反応のための精製を行わないで用いた。この構築体のためのプライマーは下記の表５に示す。

【表５】

表５．　tdh／kbl 欠失プライマー

ﾌﾟﾗｲﾏｰ名	ﾌﾟﾗｲﾏｰ内に設計された制限酵素	プライマー配列	配列番号
p70 DR	なし	CTCAGTTCATCCATCAAATCACCAAGTCCG	175
P82 DF	BbsI	TACACGTTAGAAGACGGCTAGATGCGTCTGATTGTGACAGACGGCG	176
p71 UF	なし	AACCTTCCAGTCCGGTTTACTGTCGC	177
P83 UR	BbsI	GTACCATAAGAAGACGGAGCTTGCCGTGTCCACTCCGATTATAGCAG	178
p98spc F	BbsI	CCTTGTCTTGAAGACGGAGCTGGATCCATAACTTCGTATAATG	179
p106 spc R	BbsI	GTACCATAAGAAGACGGCTAGAGGATGCATATGGCGGCCGC	180
p112 UF*	なし	CATATGCTCCGGCTCTTCAAGCAAG　（分析ﾌﾟﾗｲﾏｰ）	181
p113 DR*	なし	CCTGAGATTGATAAACATGAAGTCCTC（分析ﾌﾟﾗｲﾏｰ）	182

*分析 PCR 用プライマー

【０２８１】

ｓｉｇＤ欠失の構築はｔｄｈ／ｋｂｌの構築にほとんど従う。ｓｉｇＤ構築に用いるプライマーは表６に示す。

【表６】

表６．　sigD 構築のためのプライマー

ﾌﾟﾗｲﾏｰ名	ﾌﾟﾗｲﾏｰ内に設計された制限酵素	プライマー配列	配列番号
SigD UF	なし	ATATTGAAGTCGGCTGGATTGTGG	183
SigD UR	BglII	GCGGCAGATCTCGGCGCATTAAGTCGTCA	184
SigD DF	EcoRI	GCGGCGAATTCTCTGCTGGAAAAAGTGATACA	185
SigD DR	なし	TTCGCTGGGATAACAACAT	186
Loxspc UF	BglII	GCGGCAGATCTTAAGCTGGATCCATAACTTCG	187
Loxspc DR	EcoRI	GCGGCGAATTCATATGGCGGCCGCATAACTTC	188
SigD UO	なし	CAATTTACGCGGGGTGGTG	189
SigD DO	なし	GAATAGGTTACGCAGTTGTTG	190
Spc UR	なし	CTCCTGATCCAAACATGTAAG	191
Spc DF	なし	AACCCTTGCATATGTCTAG	192

【０２８２】
Ｂ．ＰｒｐＣ
バチルスの直接形質転換のためのＰＣＲ増幅ＤＮＡ断片の連結によりＤＮＡ分子を作成する別の実施例は遺伝子ｐｒｐＣの部分フレーム内欠失を含む。ｐｒｐＣ遺伝子を含むバチルス・ズブチリス染色体ＤＮＡの３９５３ｂｐ断片をｐ９５及びｐ９６を用いてＰＣＲにより増幅した。当該断片を固有制限酵素認識部位ＰｆｌＭＩ及びＢｓｔＸＩで切断した。これにより３つの断片、上流、下流及び中心断片を生じた。後者は欠失される断片であり、内部からｐｒｐＣ遺伝子に位置した１７０ｂｐからなる。消化混合物をＱｉａｇｅｎ　Ｑｉａｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを用いて精製し、続いてＢｉｏＲａｄ　Ｐ－６ゲルを含む１ｍＬの回転カラム中、脱塩し、２ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５で釣り合いを取った。２回目のＰＣＲ反応で、抗菌カセット、すなわちｌｏｘＰ－スペクチノマイシン－ｌｏｘＰをＢｓｔＸＩ部位を含むプライマー及びＰｆｌＭＩ部位を含む下流プライマーであって、両方がゲノムＤＮＡ断片の部位に相補的な切断部位を含むものを用いて増幅させせた。当該断片をＰｆｌＭＩ及びＢｓｔＸＩを用いて消化し、上述の染色体断片について説明した通り精製した。上流、抗菌カセット及び下流断片の３つの断片連結を上述のｔｄｈ／ｋｂｌに関しての通り、行った。下記にさらに詳細を説明する通り、所望の連結生成物の収量は類似しており、連結生成物をｘｙｌＲｃｏｍＫコンピテントバチルス・ズブチリスの形質転換に関するさらなる処理を行うことなく用いた。

【表７】

表7． prpC欠失プライマー

プライマー名	プライマー内に設計された制限酵素	プライマー配列	配列番号
p95 DF	なし	GCGCCCTTGATCCTAAGTCAGATGAAAC	193
p96 UR	なし	CGGGTCCGATACTGACTGTAAGTTTGAC	194
p100 spc R	PflMI	GTACCATAACCATGCCTTGGTTAGGATGCATATGGCGGCCGC	195
p101 spc F	BstXI	CCTTGTCTTCCATCTTGCTGGAGCTGGATCCATAACTTCGTATAATG	196
p114 anal.	なし	GAGAGCAAGGACATGACATTGACGC	197
p115 anal.,*	なし	GATCTTCACCCTCTTCAACTTGTAAAG	198

*anal、分析PCRプライマー

【０２８３】

Ｃ．ＰｃｋＡ欠失

上述の欠失に加えて、ｐｃｋＡも修飾した。ＰＣＲプライマーのｐｃｋＡＵＦ、ｐｃｋＡ－２Ｕｒｆｕｓ、ｓｐｃ　ｆｆｕｓ、ｓｐｃ　ｒｆｕｓ、ｐｃｋＡ　Ｄｆｆｕｓ及びｐｃｋＡ　ＤＲをＰＣＲ及びテンプレートとしてバチルス・ズブチリス１６８誘導体の染色体ＤＮＡ及びｐＤＧ１７２６（Ｇｕｅｒｏｕｔ－Ｆｌｅｕｒｙ　ｅｔ　ａｌ．、Ｇｅｎｅ　１６７（１－２）：３３５－６［１９９５］を参照）を用いるＰＣＲ融合反応に関して用いた。プライマーを表８に示す。これらの欠失変異体を構築するのに使用する方法は上述の方法１と同じである。

【表８】

表8． PckA欠失のために用いるプライマー

プライマー名	プライマー内に設計された制限酵素	プライマー配列	配列番号
pckA UF	なし	TTTGCTTCCTCCTGCACAAGGCCTC	199
pckA-2URfus	なし	CGTTATTGTGTGTGCATTTCCATTGT	200
spc ffus	なし	CAATGGAAATGCACACACAATAACGTGACTGGCAA GAGA	201
pckA DFfus	なし	GTAATGGCCCTCTCGTATAAAAAAC	202
spc rfus	なし	GTTTTTTATACGAGAGGGCCATTACCAATTAGAAT GAATATTTCCC	203
pckA DR	なし	GACCAAAATGTTTCGATTCAGCATTCCT	204

【０２８４】

Ｄ．連結ＤＮＡを用いるキシロース導入コンピテンス宿主細胞形質転換

２００１年８月１０日に出願され、ここに引用する米国特許出願番号第０９／９２７，１６１号に記載されているように、部分遺伝子型ｘｙｌＲｃｏｍＫを有する宿主株バチル

ス・ズブチリスの細胞を１％キシロースを含むＬＢ培地中で２時間成長させることによりコンピテントにし、ＯＤ$_{550}$を１とした。この培養物を６時間培養物から取り除いた。全ての培養物を３７℃で、３００ｒｐｍで振とうさせながら成長させた。０．３ｍＬのアリコートを１：１の培養物と３０％グリセロール混合物として丸底２ｍＬ管内に冷凍し、その後の使用のために液体窒素中で保存した。

【０２８５】

形質転換のために、凍結コンピテント細胞を３７℃で解凍し、解凍が完了してすぐに、連結反応混合物由来のＤＮＡを５～１５μＬ／管のレベルで加えた。当該管をそれから６０分間、３７℃で１４００ｒｐｍで振とうした（Ｔｅｋｍａｒ　ＶＸＲ　Ｓ－１０）。形質転換混合物を１００ｐｐｍのスペクチノマイシンを含む８ｃｍＬＡプレート上の１００μＬアリコート中で希釈しないでプレートした。一晩中成長させた後、形質転換体をＬＢ培地（１００ｐｐｍスペクチノマイシン）中に採取し、及び当業者に公知の通り実施されるゲノムＤＮＡ単離のために３７℃で成長させた（例えば、Ｈａｒｗｏｏｄ　ａｎｄ　Ｃｕｔｔｉｎｇｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｂａｃｉｌｌｕｓ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎ，ニューヨーク、Ｎ．Ｙ．［１９９０］、２３頁を参照）。５μＬの連結反応混合物を形質転換に用いた場合、通常、４００～１４００の形質転換体が１００μＬの形質転換混合物から得られた。

【０２８６】

抗菌マーカーが入来ＤＮＡ内の２つのｌｏｘＰ部位間に位置する場合、マーカーはＣｒｅタンパク質を発現できるｃｒｅ遺伝子を含むプラスミドを含む株を形質転換することにより除去できる。細胞は３７℃～４２℃で培養したｐＣＲＭ－ＴＳｐｌｅｏ（下記参照）を用いて形質転換し、ＬＡ上にプレートし、コロニー生成後、１００ｐｐｍのスペクチノマイシンを含むＬＡ上に継ぎ合せた。一晩中培養後に成長していなかったパッチは抗菌マーカーを失ったと考えられる。マーカーの損失は所定の遺伝子に適したプライマーを用いるＰＣＲ分析により確認した。

【０２８７】

ｐＣＲＭ－ＴＳ－ｐｌｅｏは以下の配列を有する（配列番号２０５）：

【式５４】

【０２８８】

GGGGATCTCTGCAGTGAGATCTGGTAATGACTCTCTAGCTTGAGGCATCAAATAAAACGAAAG
GCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTA
GGACAAATCCGCCGCTCTAGCTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCT
ACAAACTCTTGTTAACTCTAGAGCTGCCTGCCGCGTTTCGGTGATGAAGATCTTCCCGATGATT
AATTAATTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATGCAGCAATGGCAAGAACGTTGC
TCTAGAATAATTCTACACAGCCCAGTCCAGACTATTCGGCACTGAAATTATGGGTGAAGTGGTC
AAGACCTCACTAGGCACCTTAAAAATAGCGCACCCTGAAGAAGATTTATTTGAGGTAGCCCTT
GCCTACCTAGCTTCCAAGAAAGATATCCTAACAGCACAAGAGCGGAAAGATGTTTTGTTCTACA
TCCAGAACAACCTCTGCTAAAATTCCTGAAAAATTTTGCAAAAAGTTGTTGACTTTATCTACAAG
GTGTGGCATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTAAGCTTAGGAGGGAGTGTTAAATG
TCCAATTTACTGACCGTACACCAAAATTTGCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAG
GTTCGCAAGAACCTGATGGACATGTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACCTGGAAA
ATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAACCGGAAATGGTTT
CCCGCAGAACCTGAAGATGTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTGGCAGTA
AAAACTATCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGTCGGTCCGGGCTGCCACGA
CCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGGTTATGCGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATGCC
GGTGAACGTGCAAAACAGGCTCTAGCGTTCGAACGCACTGATTTCGACCAGGTTCGTTCACTC
ATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTGGCATTTCTGGGGATTGCTTATAACA
CCCTGTTACGTATAGCCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTACTGACGGTG
GGAGAATGTTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTGGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAG
GCACTTAGCCTGGGGGTAACTAAACTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGAT
GATCCGAATAACTACCTGTTTTGCCGGGTCAGAAAAAATGGTGTTGCCGCGCCATCTGCCACC
AGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTGGAAGGGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTACGGC
GCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCGGAGC
CGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTTCAATACCGGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGA
CCAATGTAAATATTGTCATGAACTATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGC
GCCTGCTGGAAGATGGCGATTAGGAGCTCGCATCACACGCAAAAAGGAAATTGGAATAAATGC
GAAATTTGAGATGTTAATTAAAGACCTTTTTGAGGTCTTTTTTTCTTAGATTTTTGGGGTTATTTA
GGGGAGAAAACATAGGGGGGTACTACGACCTCCCCCCTAGGTGTCCATTGTCCATTGTCCAA
ACAAATAAATAAATATTGGGTTTTTAATGTTAAAAGGTTGTTTTTTATGTTAAAGTGAAAAAAACA
GATGTTGGGAGGTACAGTGATAGTTGTAGATAGAAAAGAAGAGAAAAAAGTTGCTGTTACTTTA
AGACTTACAACAGAAGAAAATGAGATATTAAATAGAATCAAAGAAAAATATAATATTAGCAAATC
AGATGCAACCGGTATTCTAATAAAAAAATATGCAAAGGAGGAATACGGTGCATTTTAAACAAAA
AAAGATAGACAGCACTGGCATGCTGCCTATCTATGACTAAATTTTGTTAAGTGTATTAGCACCG
TTATTATATCATGAGCGAAAATGTAATAAAAGAAACTGAAAACAAGAAAAATTCAAGAGGACGT

AATTGGACATTTGTTTTATATCCAGAATCAGCAAAAGCCGAGTGGTTAGAGTATTTAAAAGAGT
TACACATTCAATTTGTAGTGTCTCCATTACATGATAGGGATACTGATACAGAAGGTAGGATGAA
AAAAGAGCATTATCATATTCTAGTGATGTATGAGGGTAATAAATCTTATGAACAGATAAAAATAA
TTAACAGAAGAATTGAATGCGACTATTCCGCAGATTGCAGGAAGTGTGAAAGGTCTTGTGAGA
TATATGCTTCACATGGACGATCCTAATAAATTTAAATATCAAAAAGAAGATATGATAGTTTATGG
CGGTGTAGATGTTGATGAATTATTAAAGAAAACAACAACAGATAGATATAAATTAATTAAAGAAA
TGATTGAGTTTATTGATGAACAAGGAATCGTAGAATTTAAGAGTTTAATGGATTATGCAATGAAG
TTTAAATTTGATGATTGGTTCCCGCTTTTATGTGATAACTCGGCGTATGTTATTCAAGAATATAT
AAAATCAAATCGGTATAAATCTGACCGATAGATTTTGAATTTAGGTGTCACAAGACACTCTTTTT
TCGCACCAGCGAAAACTGGTTTAAGCCGACTGGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGAT
GGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGAT
TGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAG
TGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCG
TCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCTGACCA
CCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAG
GCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACTGCTGACGCCGCTGCGCGATCAGT
TCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAAC
GCCTGGGTCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGT
GCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAG
GGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATT
ACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCA
GCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACTATCCC
GACCGCCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCG
TACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCCACA
CCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAA
CCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCAT
ATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCG
CCGGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAATAACCGGGCAGGCCATGTC
TGCCCGTATTTCGCGTAAGGAAATCCATTATGTACTATTTCAAGCTAATTCCGGTGGAAACGAG
GTCATCATTTCCTTCCGAAAAAACGGTTGCATTTAAATCTTACATATGTAATACTTTCAAAGACT
ACATTTGTAAGATTTGATGTTTGAGTCGGCTGAAAGATCGTACGTACCAATTATTGTTTCGTGAT
TGTTCAAGCCATAACACTGTAGGGATAGTGGAAAGAGTGCTTCATCTGGTTACGATCAATCAAA
TATTCAAACGGAGGGAGACGATTTTGATGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATG
CCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAA
CGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAA
CAACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGC
GCCGTCGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGG
TGTCGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCG
CAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAA
GCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTA
TTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGCATTGGGTCACC
AGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGC
TGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGT
GCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATG
CTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGC
GCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCC
CGCCGTCAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTG
CTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAA
AAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAT
TAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAA
TGTGAGTTAGGCATCGCATCCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACAC
ATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAG
CGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCAC
CATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCC
GCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA
CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG

CTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGAC
AGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGAC
CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATG
CTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA
TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGT
ATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC
CGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG
AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA
AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAA
ATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGAC
TCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATG
ATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG
GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCG
GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGG
CATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAG
GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGT
TGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG
AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCA
CATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCAT
CTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGG
GAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATT
TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG
GGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCCAATAGACCAGTTGCAATCCAAA
CGAGAGTCTAATAGAATGAGGTCGAAAAGTAAATCGCGTAATAAGGTAATAGATTTACATTAGA
AAATGAAAGGGGATTTTATGCGTGAGAATGTTACAGTCTATCCCGGCATTGCCAGTCGGGGAT
ATTAAAAAGAGTATAGGTTTTTATTGCGATAAACTAGGTTTCACTTTGGTTCACCATGAAGATGG
ATTCGCAGTTCTAATGTGTAATGAGGTTCGGATTCATCTATGGGAGGCAAGTGATGAAGGCTG
GCGCTCTCGTAGTAATGATTCACCGGTTTGTACAGGTGCGGAGTCGTTTATTGCTGGTACTGC
TAGTTGCCGCATTGAAGTAGAGGGAATTGATGAATTATATCAACATATTAAGCCTTTGGGCATT
TTGCACCCCAATACATCATTAAAAGATCAGTGGTGGGATGAACGAGACTTTGCAGTAATTGATC
CCGACAACAATTTGATTACAAATAAAAAGCTAAAATCTATTATTAATCTGTTCCTGCAGGAGAGA
CCG

Ｅ．　トランスクリプトームＤＮＡアレイ法

上述の方法に加えて、トランスクリプトームＤＮＡアレイ法を本発明の変異体を発達させるために用いた。まず、標的ＲＮＡを当業者に公知のグアニジン酸（ｇｕａｎｉｄｉｎｉｕｍ　ａｃｉｄ）フェノール抽出によりバチルス株から取り入れ（例えば、Ｆａｒｒｅｌｌ、<u>ＲＮＡ　Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｉｅｓ</u>、（第２版）．Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，サンディエゴ、８１頁を参照）、及び時点をｄｅＳａｉｚｉｅｕ　ｅｔ　ａｌ．（ｄｅＳａｉｚｉｅｕ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８２：４６９６－４７０３［２００３］）及びここに記載する方法から適合させた方法によりビオチン標識ｃＤＮＡ内に逆転写した。合計ＲＮＡ（２５ｍｇ）を３７℃、１００ｍＬ反応中で一晩中培養した：１×ＧＩＢＣＯ　一本鎖（ｆｉｒｓｔ－ｓｔｒａｎｄ）緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．３、７５ｍＭ　ＫＣｌ、３ｍＭ　$MgCl_2$）；１０ｍＭ　ＤＴＴ；４０ｍＭランダムヘキサマー；０．３ｍＭの各ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ及びｄＴＴＰ；０．１２ｍＭ　ｄＡＴＰ；０．３ｍＭ　ビオチン－ｄＡＴＰ（ＮＥＮ０；２５００単位　ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩ　逆転写酵素（ロシュ）。ＲＮＡを除去するために、当該反応を０．２５Ｍ　ＮａＯＨに加え、３０分間、６５℃で培養した。当該反応をＨＣｌ及び２．５Ｍ　酢酸アンモニウムを含むエタノール中で－２０℃で沈殿させた核酸を用いて中和させた。ペレットを洗浄、空気乾燥し、水中で再懸濁させ、ＵＶ分光法により量を測った。反応収量は約２０～２５ｍｇビオチン標識ｃＤＮＡであった。

【０２８９】

１２ｍｇのこのｃＤＮＡを、１０分間、３７℃で３．７５ミリ単位のＤＮＡアーゼを含

む３３ｍＬ　１×Ｏｎｅ－Ｐｈｏｒ－Ａｌｌ緩衝液（Ａｍｅｒｓｈａｍ－Ｐｈａｒｍａｃｉａ番号２７－０９０１－０２）において断片化した。ＤＮＡアーゼを熱殺菌後、３％アガロースゲル上の２ｍｇの断片化ｃＤＮＡを管理することにより確認した。ビオチン含有ｃＤＮＡの大きさは通常、２５～１２５ヌクレオチドの範囲である。残りの１０ｍｇのｃＤＮＡをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘバチルス遺伝子チップアレイにハイブリダイズした。

【０２９０】

ハイブリダイゼーションをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ発現分析技術マニュアル（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）に記載されている通りに、供給元が提示する試薬を用いて行った。要するに、１０ｍｇの断片化ビオチン標識ｃＤＮＡを２２０ｍＬの以下を含むハイブリダイゼーション混合物に加えた：１００ｍＭ　ＭＥＳ（Ｎ－モルホリノエタンスルホン酸）、１Ｍ　Na^{+}、２０ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ２０；５ｍｇ／ｍＬ合計酵母ＲＮＡ；０．５ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡ；０．１ｍｇ／ｍＬニシン精子ＤＮＡ；５０ｐＭ対照オリゴヌクレオチド（ＡＦＦＸ－Ｂ１）。当該混合物を５分間、９５℃に加熱し、５分間４０℃に冷却し、粒子を除去するために手短に遠心分離し、及び２００ｍＬをそれぞれ前もって温め、すすいでおいた（１×ＭＥＳ緩衝液＋５ｍｇ／ｍｌ酵母ＲＮＡ）遺伝子チップカートリッジ内に注入した。当該アレイを４０℃で一晩中回転させた。

【０２９１】

当該サンプルを除去し、アレイを非ストリンジェントな洗浄緩衝液（６×ＳＳＰＥ、０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０）を用いて充填し、手順Ｅｕｋ－ＧＥ－ＷＳ２を用いるＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　流体ステーション上で非ストリンジェント及びストリンジェント（０．１Ｍ　ＭＥＳ，０．１Ｍ［Na^{+}］、０．０１％Ｔｗｅｅｎ２０）洗浄緩衝液を用いて洗浄した。アレイを３つの工程で着色した：（１）ストレプトアビジン；（２）ビオチンで標識した抗ストレプトアビジン抗体；（３）ストレプトアビジン－フィコエリトリン結合。

【０２９２】

アレイ中のシグナルをヒューレット・パッカード遺伝子アレイスキャナーで３ｍｍピクセル解像度の５７０ｎｍレーザー光を用いて検出した。４３５１ＯＲＦプローブセットのシグナル強度を時間的経過実験を含む全ての時点にわたって測定及び標準化した。これらのシグナルをそれから実験中、遺伝子の相対発現レベルを推測するために比較した。トレオニン生合成系及び分解系遺伝子を同時に転写し、非効率なトレオニン利用を示した。分解系トレオニン経路の欠失は所望の生成物の発現を向上させた（図７を参照）。本発明はトレオニン生合成系及び分解系プロファイルに類似した転写プロファイルを含む経路を修飾する手段を提供する。従って、本発明はバチルス株を最適化するためにトレオニンに類似した転写プロファイルを含む経路の修飾にも使用できる。いくつかの好ましい実施態様において、ｒｏｃＡ、ｙｃｇＮ、ｙｃｇＭ、ｒｏｃＦ及びｒｏｃＤからなる群より選択される少なくとも１の遺伝子が欠失または修飾される。ここに記載した本発明を用いて、ｓｉｇＤレギュロンが転写されたという驚くべき発見をした。この遺伝子の欠失は所望の生成物のより優れた発現を生じる（図７を参照）。ｇａｐＢ及びｐｃｋＡの転写も驚くべき発見であった。ｐｃｋＡの欠失は改善または損失のいずれももたらさなかった。しかしながら、本発明はｐｃｋＡ欠失または修飾とｇａｐＢ及び／またはｆｂｐの欠失または修飾の組み合わせにより株タンパク質の生成を向上させる手段を提供する。さらに、本発明の開発時に、トリプトファン生合成経路遺伝子は不均衡な転写を示すことが観測された。従って、本発明は、ｔｒｐＡ、ｔｒｐＢ、ｔｒｐＣ、ｔｒｐＤ、ｔｒｐＥ、及び／またはｔｒｐＦからなる群より選択される遺伝子などの転写が増加した株を生成するのに使用でき、改善株は母体（すなわち、野生型及び／または起源株）と比較して所望の生成物の発現が向上すると考えられる。実際に、これらの遺伝子修飾の任意の組み合わせは所望の生成物の発現の向上をもたらすと考えられる。

【０２９３】

Ｆ．発酵

上述の構築体を用いて生成した株分析は以下の発酵を行った。大きさ１４Ｌの培養はＢｉｏｌａｆｉｔｔｅ（登録商標）発酵器中で行った。７リットル当たりの培養成分を表９

に記載する。

【表９】

表９．　７Ｌ発酵物当たりの培地成分

NaH2PO4－H2O	0.8%	56g
KH2PO4	0.8%	56g
MgSO4－7H2O	0.28%	19.6g
消泡剤	0.1%	7g
CaCl2－2H2O	0.01%	0.7g
硫酸鉄－7H2O	0.03%	2.1g
MnCl2－4H2O	0.02%	1.4g
微量金属 100 x ストック*	1%	70g
H2SO4	0.16%	11.2g
60% グルコース	1.29%	90

*上述の Harwood and Cutting、P.５４９、参照

【０２９４】

７５０ｒｐｍで槽を撹拌し、気流を１１リットル／分、温度３７℃に調整し、ｐＨをNH_4OHを用いて６．８に維持した。６０％グルコース溶液を０．５～２．１グラム／分で開始から発酵の終わりまで直線ランプ中で約１４時間送った。炭素収支及び効率はグルコース供給、タンパク質生成物の収量、細胞集団収量、培養液中のその他の炭素及び発生CO_2から計算した。変異体株を改善点を検証するために母体株と比較した。この変異ｐｃｋＡ株はこれらの条件下では改善を示さなかったが、改善は修飾培養条件（すなわち、当業者に公知のもの）下及び／または別の遺伝子と組み合わせて生じると考えられる。いくつかの好ましい実施態様において、これらの別の遺伝子はｇａｐＢ、ａｌｓＤ及び／またはｆｂｐからなる群より選択される。

【０２９５】

実施例４

変異バチルス株を得るための宿主細胞形質転換

上述の方法１または２によりＤＮＡ構築体を作成すると、それを適当なバチルス・ズブチリス研究所株内に形質転換した（例えば、ＢＧ２０３６または、ＢＧ２０９７；任意のコンピテントバチルス直接宿主細胞は本発明の方法に使用できる）。当該細胞は０．５ｐｐｍのフレオマイシンまたは１００ｐｐｍのスペクチノマイシンの選択培地上に必要に応じてプレートした（Ｆｅｒｒａｒｉ　ａｎｄ　Ｍｉｌｌｅｒ、Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ：Ｕｓｉｎｇ　Ｎａｔｕｒｅ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ａｒｔ　ｏｆ　ＥｘｐｒｅｓｓｉｏｎのＢａｃｉｌｌｕｓ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ　Ｇｒａｍ－Ｐｏｓｉｔｉｖｅ　Ｍｏｄｅｌ（バチルス発現：グラム陽性モデル）、６５～９４頁［１９９９］）。研究所株はバチルス・ズブチリス生成宿主株内に２回、またはＢＧ３５９４及びそれからＭＤＴ９８－１１３に一度形質転換した欠失を有する染色体ＤＮＡの供給源として用いた。形質転換体は１のコロニーに単離するためにストリーキングし、５ｍＬのＬＢと適当な抗菌剤中で一晩中採取及び成長させた。染色体ＤＮＡを当業者に公知の通り単離した（例えば、Ｈａｒｄｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．、上述参照）。

【０２９６】
統合ＤＮＡ構築体の存在は、上述の成分及び条件を用いて３つのＰＣＲ反応により確認した。例えば、２つの反応は欠失カセット外側由来領域を１の場合において（プライマー１及び１１）抗菌遺伝子内に増幅するために設計し、他の場合において（プライマー１及び１２）全体的な挿入により増幅するために設計した。第３の照合は、欠失カセット外側由来の領域を欠失領域内（プライマー１及び４））に増幅した。図４は、正しいクローンが最初の２つの場合にはバンドを示すが、３番目の場合には示さないということを示す。野生型バチルス・ズブチリス染色体ＤＮＡは全ての反応で陰性対照として用い、第３のプライマーセットのバンドのみを増幅すべきである。
【０２９７】

実施例５
<u>振とうフラスコ分析－プロテアーゼ活性測定</u>
ＤＮＡ構築体を安定にコンピテントバチルス・ズブチリス株内に統合すると、ズブチリシン活性を振とうフラスコ分析により測定し、当該活性を野生型レベルと比較した。分析は当業者に公知のズブチリシン生成に適した５０ｍＬの成長培地を含む２５０ｍｌのバッフルフラスコ内で行った（Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２２３：１１９－１２９［１９９４］；及びＨｓｉａ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２４２：２２１－２２７［１９９６］を参照）。当該培地を５０μＬの８時間、５ｍＬ培養物と接種し、２５０ｒｐｍで振とうしながら３７℃、４０時間成長させた。そして、１ｍＬのサンプルをプロテアーゼ活性分析のために１７、２４及び４０時間の時点で取った。プロテアーゼ活性をモナコ自動分析器（Ｍｏｎａｒｃｈ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ａｎａｌｙｓｅｒ）を用いて４０５ｎＭで測定した。２つのサンプルを緩衝液中で１：１１（３．１３１ｇ／Ｌ）に希釈した。正確な機械較正を保証する対照として、１のサンプルを１：６（５．５８５ｇ／Ｌ）、１：１２（２．７９３ｇ／Ｌ）及び１：１８（１．８６２ｇ／Ｌ）に希釈した。図７は種々の変異バチルス・ズブチリスクローンにおけるプロテアーゼ活性を示す。図８は、バチルス・ズブチリス野生型株（非変異）及び対応する変異欠失株（－ｓｂｏ）及び（－ｓｌｒ）の振とうフラスコ培養物から測定した改善されたプロテアーゼ分泌を示すグラフを提供する。プロテアーゼ活性（ｇ／Ｌ）を１７、２４及び４０時間後に測定した。
【０２９８】
また、細胞密度はＯＤ６００で分光光度測定を用いて測定した。測定時間でのサンプルの著しい違いは見られなかった（データは示していない）。
【０２９９】
上述の明細書中に言及した全ての文献及び特許はここに引用するものとする。言及した本発明の方法及びシステムの種々の修正及び変更は本発明の範囲及び精神を逸脱することなく当業者に明らかである。本発明は特定の好ましい実施態様に関連して説明したが、本発明は当該特定の実施態様に過度に限定されるものではないことは当然のことである。実際に、当業界及び関連分野の当業者に明らかである本発明を実施するための前述の方法の種々の変更は本発明の範囲内である。
【図面の簡単な説明】
【０３００】
【図１Ａ】図１Ａは本発明により提供されるの１の方法（“方法１”実施例１参照）の一般的な説明図を示すものである。この方法において、遺伝子のフランキング領域及び／または固有染色体領域は野生型バチルス染色体から増殖され、制限酵素（少なくともＢａｍＨＩを含む）で切断し、ｐＪＭ１０２に連結する。当該構築体は大腸菌によりクローンされ、及びプラスミドを単離し、ＢａｍＨＩを用いて線形化し、相補的末端を含む抗菌マーカーに連結する。大腸菌で再度クローニングした後、液体培養物を成長させ、バチルス宿主株（好ましくは、コンピテントバチルス宿主株）の形質転換に用いるプラスミドＤＮＡを単離するために用いる。

【図１Ｂ】図１Ｂは本発明により提供されるの１の方法（“方法１”実施例１参照）の一般的な説明図を示すものである。この方法において、遺伝子のフランキング領域及び／または固有染色体領域は野生型バチルス染色体から増殖され、制限酵素（少なくともＢａｍＨＩを含む）で切断し、ｐＪＭ１０２に連結する。当該構築体は大腸菌によりクローンされ、及びプラスミドを単離し、ＢａｍＨＩを用いて線形化し、相補的末端を含む抗菌マーカーに連結する。大腸菌で再度クローニングした後、液体培養物を成長させ、バチルス宿主株（好ましくは、コンピテントバチルス宿主株）の形質転換に用いるプラスミドＤＮＡを単離するために用いる
【図２】図２は本発明のいくつかの実施態様に従うＤＮＡカセットの構築において用いるプライマーの位置を示す。図はここで用いるプライマー命名システムの説明を提供する。プライマー１及び４は欠失の存在をチェックするために用いる。これらのプライマーは“欠失Ｘ－ＵＦ－ｃｈｋ”及び“欠失Ｘ－ＵＲ－ｃｈｋ－ｄｅｌ”と呼ぶ。欠失Ｘ－ＵＦ－ｃｈｋも、染色体中に存在するカセットの陽性チェックのための抗生物質マーカー内のリバースプライマー（プライマー１１：ＰＢＳＸ－ＵＲ－ｃｈｋ－Ｄｅｌと呼ばれる）を用いてＰＣＲ反応において用いる。プライマー２及び６は上流フランキング領域を増殖するために用いる。これらのプライマーは“欠失Ｘ－ＵＦ”及び“欠失Ｘ－ＵＲ”と呼び、黒の縦棒のところで組換え制限部位を含む。プライマー５及び８は下流フランキング領域を増幅するために用いる。これらのプライマーは“欠失Ｘ－ＤＦ”及び“欠失Ｘ－ＤＲ”と呼ぶ。これらのプライマーは連結及びクローニングのための組換えＢａｍＨＩ部位またはＰＣＲ融合で用いるバチルス・ズブチリス染色体の適当な部分に相同な２５塩基対末端を含むことができる。いくつかの実施態様において、プライマー３及び７はＰＣＲ融合により作成したカセットの場合、当該カセットを一緒に融合するために用いられ、一方、他の実施態様において、それらは挿入の存在をチェックするために用いられる。これらのプライマーは“欠失Ｘ－ＵＦ－ネスティド”及び“欠失Ｘ－ＤＲ－ネスティド”と呼ぶ。いくつかの実施態様において、“抗生物質マーカー”に対応する配列はＳｐｃ耐性マーカーであり、欠失する領域はＣｓｓＳ遺伝子である。
【図３】図３は本発明の１の方法（“方法２”；実施例２を参照）の一般的な説明図である。フランキング領域は選択マーカー配列に相補的な２５ｂｐの配列を含むように設計される。選択マーカー配列は１のフランキング領域のＤＮＡに相補的である２５ｂｐの末端も含む。フランキング領域末端に近いプライマーは単一反応チューブにおける３つすべてのテンプレートを増幅するために用いられ、それにより融合断片を作成する。この融合断片またはＤＮＡ構築体はコンピテントバチルス宿主株に直接形質転換される。
【図４】図４はバチルスＤＨＢ欠失クローンのエレクトロフォレーシスゲルを提供する。レーン１及び２はプライマー１及び１１を用いて増幅されたＤＨＢ欠失を有する２つの株を描き、不活性化染色体断片の上流からフレオマイシン・マーカー内に増幅した１．２バンドを表す。レーン３はこの反応の野生型対照を表す。非特異増幅のみが観測される。レーン４及び５はプライマー９及び１２を用いて増幅されたＤＨＢ欠失株を表す。この２ｋｂバンドは抗生物質領域から不活性化染色体断片の下流部分以下まで増幅する。レーン６はこの反応の陰性対照であり、バンドは示されていない。レーン７及び８はプライマー１及び４を用いて増幅した欠失株を表し、当該説明図によりＤＨＢ領域がないことが確認される。レーン９は野生型対照である。
【図５】図５はバチルス・ズブチリス（野生型）の生成株の２つのクローンのゲルエレクトロフォレーシスを表し、ｓ／ｒはｓ／ｒ遺伝子の欠失を生じるフレオマイシン（ｐｈｌｅｏ）マーカーで置換される。レーン１及び２は位置１及び１１でプライマーを用いて増幅したクローン表す。レーン３は同じプライマーを用いて増幅した野生型染色体ＤＮＡである。１．２ｋｂのバンドが挿入に関して観測される。レーン４及び５は位置９及び１２でプライマーを用いて増幅したクローンを表す。レーン６は同じプライマーを用いて増幅した野生型染色体ＤＮＡである。正確な形質転換体は２ｋｂのバンドを含む。レーン７及び８は位置２及び４でプライマーを用いて増幅したクローンを表す。レーン９は同じプライマーを用いて増幅した野生型染色体ＤＮＡである。欠失株に関してバンドは観測されな

いが、１ｋｂ周辺のバンドが野生型において観測される。プライマー位置の説明のため、図２を参照されたい。

【図６】図６はバチルス・ズブチリス（野生型）の生成株のクローンのエレクトロフォレーシスゲルを提供し、ｃｓｓＳはｓｐｃマーカーを染色体内に統合することにより不活性化される。レーン１は非統合の対照であり、約１．５ｋｂ小さい。

【図７】図７はバチルス・ズブチリス野生型株（非変異）及び種々の欠失を有する対応する変異バチルス・ズブチリス株を含む振とうフラスコ培養物から測定したズブチリシン分泌の改善を示す棒グラフである。プロテアーゼ活性（ｇ／Ｌ）は１７、２４及び４０時間後、または２４及び４０時間の時点で測定した。

【図８】図８はバチルス・ズブチリス野生型株（非変異）及び対応する変異欠失株（－ｓｂｏ）及び（－ｓｌｒ）における振とうフラスコ培養物から測定したズブチリシン分泌の改善を示す棒グラフである。プロテアーゼ活性（ｇ／Ｌ）は１７、２４及び４０時間後に測定した。

【図１Ａ】

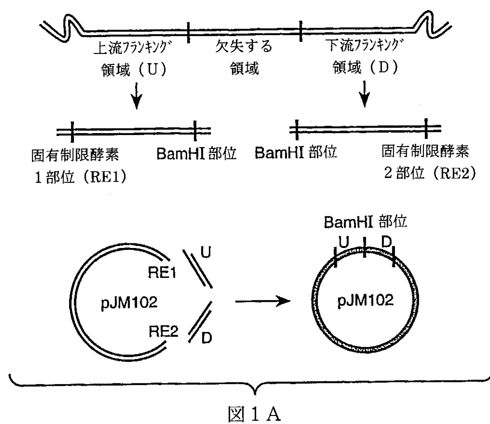


図1Ａ

【図１Ｂ】

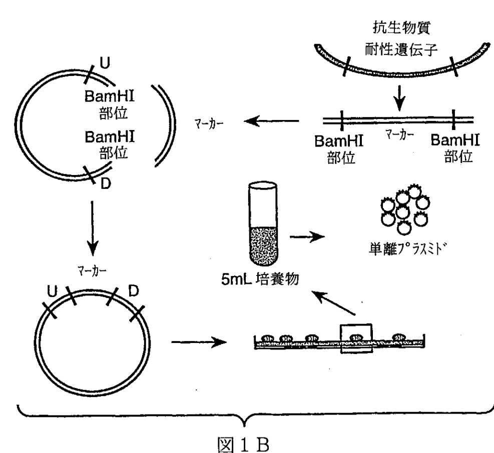


図1Ｂ

【図２】

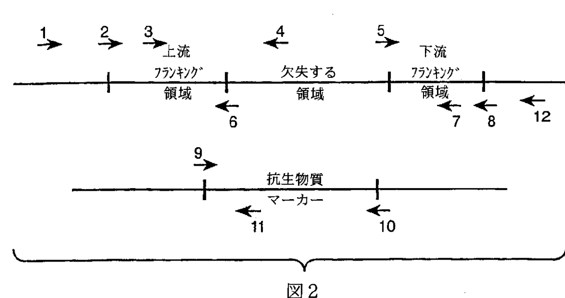


図2

【図３】

上流ﾌﾗﾝｷﾝｸﾞ
領域（U）
欠失する
領域
下流ﾌﾗﾝｷﾝｸﾞ
領域（D）
BamHI 部位
BamHI 部位
固有制限酵素
１部位（RE1）
固有制限酵素
２部位（RE2）
ﾏｰｶｰ
U
ﾏｰｶｰ
D

図３

【図４】

図４

【図５】

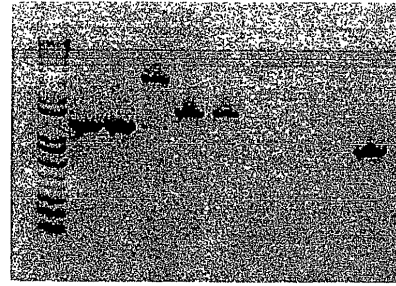


図５

【図６】

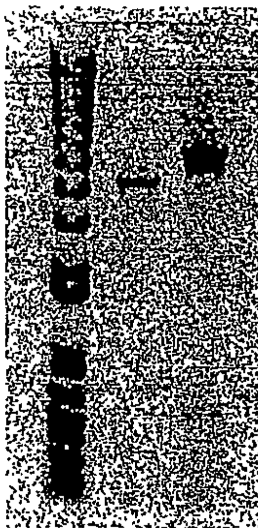


図６

【図７】

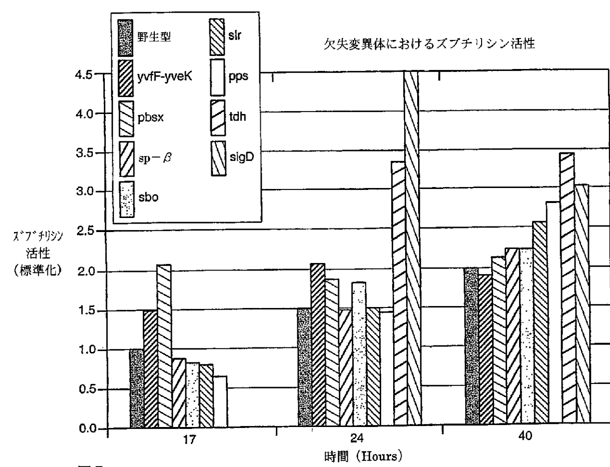


図７

【図８】

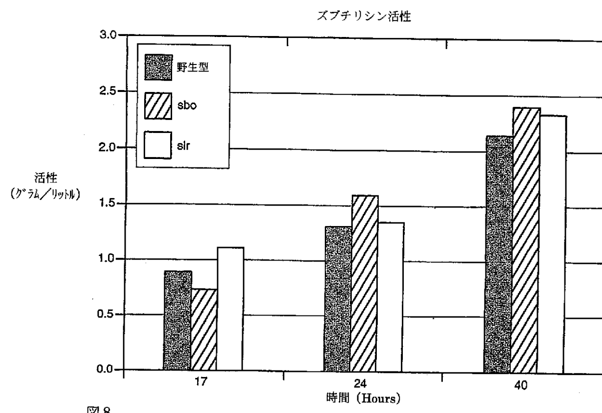

ズブチリシン活性
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
野生型
sbo
slr
活性
（グラム／リットル）
17
24
40
時間（Hours）

図8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/09585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12P 21/06; C12N 9/54, 1/20, 15/00, 15/74, 1/00
US CL : 435/252.31, 252.5, 221, 69.1, 440, 832, 471, 69.3
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/252.31, 252.5, 221, 69.1, 440, 832, 471, 69.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,387,521 A (FERRARI) 07 February 1995, see entire document.	1-13
Y	YANG et al. Alanine-scanning mutagenesis of Bacillus subtilis trp RNA-binding attenuation protein (TRAP) reveals residues involved in tryptophan binding and RNA binding. J. Mol. Biol. 1997, Vol. 270, pages 696-710, see entire document.	1-13
Y, P	US 6,528,255 B1 (ESTELL) 04 March 2003, see entire document.	1-13
Y	US 5,585,253 A (DOI et al.) 17 December 1996, see entire document.	1-13
Y	WO 99/03984 A2 (GENENCOR INTERNATIONAL, INC) 28 January 1999, see entire document.	1-13
A	YAKHNIN et al. Expression of the Bacillus subtilis trpEDCFBA operon is influenced by translational coupling and Rho termination factor. J. Bacteriology. October 2001, Vol. 183, No. 20, pages 5918-5926, see entire document.	1-13
A	EP 0 246 678 A1 (GENENTECH, INC) 25 November 1987, see entire document.	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 July 2003 (29.07.2003)

Date of mailing of the international search report
22 AUG 2003

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer
Nita M. Minnifield
Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US03/09585

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92/19721 A1 (GENENCOR INTERNATIONAL, INC) 12 November 1992, see entire document.	1-13
Y	US 5,310,675 A (ESTELL et al) 10 May 1994, see entire document.	1-13
Y	US 5,264,366 A (FERRARI et al) 23 November 1993, see entire document.	1-13
A,P	US 6,509,185 B1 (VALLE et al) 21 January 2003, see entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/09585

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-13

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

PCT/US03/09585

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

Group I, claims 1-13, drawn to altered Bacillus strain and method for enhancing expression of protein.

Group II, claims 14-37, drawn to DNA construct.

Group III, claims 38-49, drawn to method for enhancing expression of a protease.

Group IV, claims 50-60, drawn to an altered Bacillus strain.

Group V, claims 61-64, drawn to protease producing Bacillus strain.

Group VI, claims 65-72, drawn to method for expression of a protein of interest.

Group VII, claims 73-80, drawn to method for obtaining a protein of interest from a Bacillus strain.

Group VIII, claims 81-83, drawn to method for enhancing expression of a protein of interest in Bacillus.

Group IX, claims 84-85, drawn to method for enhancing expression of a protein of interest in Bacillus.

Group X, claims 86-87, drawn to a nucleic acid sequence.

Group XI, claim 88, drawn to an amino acid sequence.

The inventions listed as Groups I-XI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Groups I, II, IV, X and XI are drawn to different products each defining different technical features that lack unity of invention. The technical feature of Group I is not special in view of the teachings of Ferrari (5387521). Ferrari discloses an altered Bacillus strain that is capable of expressing proteins/enzymes. As such the various products and methods lack unity of invention because the technical feature of Group I is not "special" in that it does not define a novel contribution over the prior art. As such, the groups of inventions lack a corresponding "special" technical feature.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST, CABA, BIOSIS, MEDLINE, JAPIO, WPIDS, BIOTECHDS, LIFESCI, CAPLUS, AGRICOLA
search terms: inventor names, bacillus strain, alter?, mutant?, mutat?, gene, heterologous protein, express?, inactivat? chromosomal gene, recited genes in claim 1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.^{7}	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 9/20	Ｃ１２Ｎ 9/20		
Ｃ１２Ｎ 9/26	Ｃ１２Ｎ 9/26		
Ｃ１２Ｎ 9/42	Ｃ１２Ｎ 9/42		
Ｃ１２Ｎ 9/54	Ｃ１２Ｎ 9/54		
Ｃ１２Ｎ 9/88	Ｃ１２Ｎ 9/88		
Ｃ１２Ｎ 9/90	Ｃ１２Ｎ 9/90		
//(Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/12	Ｃ１２Ｎ 9/12		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/12	Ｃ１２Ｎ 9/12		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/16	Ｃ１２Ｎ 9/16	Ｂ	
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/16	Ｃ１２Ｎ 9/16	Ｂ	
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/18	Ｃ１２Ｎ 9/18		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/18	Ｃ１２Ｎ 9/18		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/20	Ｃ１２Ｎ 9/20		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/20	Ｃ１２Ｎ 9/20		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/26	Ｃ１２Ｎ 9/26		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/26	Ｃ１２Ｎ 9/26		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/42	Ｃ１２Ｎ 9/42		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/42	Ｃ１２Ｎ 9/42		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/54	Ｃ１２Ｎ 9/54		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/54	Ｃ１２Ｎ 9/54		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/88	Ｃ１２Ｎ 9/88		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/88	Ｃ１２Ｎ 9/88		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		
(Ｃ１２Ｎ 9/90	Ｃ１２Ｎ 9/90		
Ｃ１２Ｒ 1:125)	Ｃ１２Ｒ 1:125		
(Ｃ１２Ｎ 9/90	Ｃ１２Ｎ 9/90		
Ｃ１２Ｒ 1:07)	Ｃ１２Ｒ 1:07		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝
(72)発明者 フェラーリ、ユージニオ
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４０６６、サン・ブルーノ、ヒコリー・アベニュー １６８１
(72)発明者 ハービソン、キャロル
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４１１７、サン・フランシスコ、１／２・オウク・ストリート １１９１
(72)発明者 ラシード、エム・ハルニュアー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４０８７、サニヴェイル、コニマーラ・ウェイ・ナンバー８１ １２５
(72)発明者 ウェイラー、ウォルター
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４１１２、サン・フランシスコ、テレサ・ストリート ２５２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA07 BA10 BA11 BA13 BA14 CA04 DA05 EA04 GA11
4B050 CC03 DD02 LL01 LL03 LL05
4B065 AA15X AA15Y AA17X AA18X AA19X AA20X AB01 AC20 BA02 CA27
CA29 CA31 CA32 CA33 CA44 CA46